

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA



Tesi di Dottorato di Ricerca
in
SCIENZE DELL’ALIMENTAZIONE E DELLA NUTRIZIONE
XXV ciclo

(Coordinatore: Prof. Franco Contaldo)

Valutazione della flora batterica intestinale in pazienti con diverso stato di nutrizione confrontando metodiche colturali e di biologia molecolare

Relatore:

Ch.^{mo} Prof.

Franco Contaldo

Correlatore:

Ch.^{ma} Prof.ssa

Ida Torre

Dottoranda:

Dott.ssa Carmela Iervolino

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

1. Introduzione	3
1.1 Caratterizzazione del microbiota intestinale	3
1.2 Funzioni del microbiota	7
1.3 Funzioni metaboliche del microbiota	10
1.4 Microbiota ed infiammazione	13
1.5 Microbiota in differenti condizioni nutrizionali: obesità, anoressia nervosa, sindrome dell'intestino corto, chirurgia bariatrica	18
1.6 Microbiota ed epatosteatosi	29
2. Scopo dello studio	31
3. Pazienti e Metodi	32
3.1 Popolazione in studio	32
3.2 Parametri antropometrici	33
3.3 Calorimetria indiretta	34
3.4 Bioimpedenziometria (BIA)	34
3.5 Questionario sulle abitudini alimentari	37
3.6 Ecografia epatica	37
3.7 Indagini di laboratorio	38
3.8 Raccolta campioni di feci	38
3.9 Determinazione degli acidi grassi a catena corta fecali (SCFA)	39
3.10 Analisi della flora batterica intestinale	40
3.10.1 Saggio PCR real-time	40
3.10.2 Metodo colturale	43

4. Analisi statistica	45
5. Risultati	46
5.1 Microbiota intestinale	48
5.2 Acidi grassi a catena corta fecali	53
6. Discussione	55
7. Conclusioni	59
8. Bibliografia.....	61

1. Introduzione

1.1 Caratterizzazione del microbiota intestinale

L'intestino umano rappresenta un ecosistema in cui miliardi di batteri convivono ed interagiscono con l'organismo ospite, rappresentando un "organo metabolico" capace di regolare molte funzioni sistemiche, contribuire allo stato di salute, avere un ruolo in molte malattie gastrointestinali (colon irritabile, malattie infiammatorie croniche, diverticolite, cancro del colon) e sistemiche (allergie, obesità, diabete di tipo 2, aterosclerosi) (1-3).

Il tratto gastrointestinale ospita tra 500 e 1000 differenti specie di batteri che mantengono, in condizioni fisiologiche, una relazione simbiotica con l'ospite. Il numero di cellule batteriche è dieci volte superiore al numero delle cellule eucariotiche umane (4).

La disponibilità per molto tempo delle sole metodiche colturali ha condizionato lo studio del microbiota intestinale, consentendo di identificare le sole specie batteriche vitali.

Lo sviluppo di tecniche basate sul sequenziamento della subunità 16S dell'RNA ribosomiale, consentendo il rilievo di batteri "viventi" e "non viventi", ha facilitato l'identificazione e la classificazione di nuove specie batteriche. È stato dunque possibile identificare e studiare il "metaboloma", cioè il complesso superorganismo costituito dal genoma di microbiota ed ospite, e la sua influenza sullo stato di salute e di malattia.

Il microbioma, cioè il genoma batterico complessivo, è 100 volte superiore rispetto al genoma umano ed è principalmente rappresentato da anaerobi. I batteri dominanti nell'uomo adulto

appartengono a tre gruppi prevalenti: i *Firmicutes*, gram positivi, i *Bacteroidetes*, gram negativi e gli *Actinobacteria*, gram positivi. Ai *Firmicutes* appartengono 200 generi tra cui i Lattobacilli, i Mycoplasmi, i Bacilli e i Clostridi. Ai *Bacteroidetes* appartengono 20 generi.

La concentrazione dei microrganismi è molto alta nella cavità orale, e consiste principalmente di anaerobi come *Prevotellae*, *Peptostreptococchi*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* ed *Eubacteria*. (Figura 1)

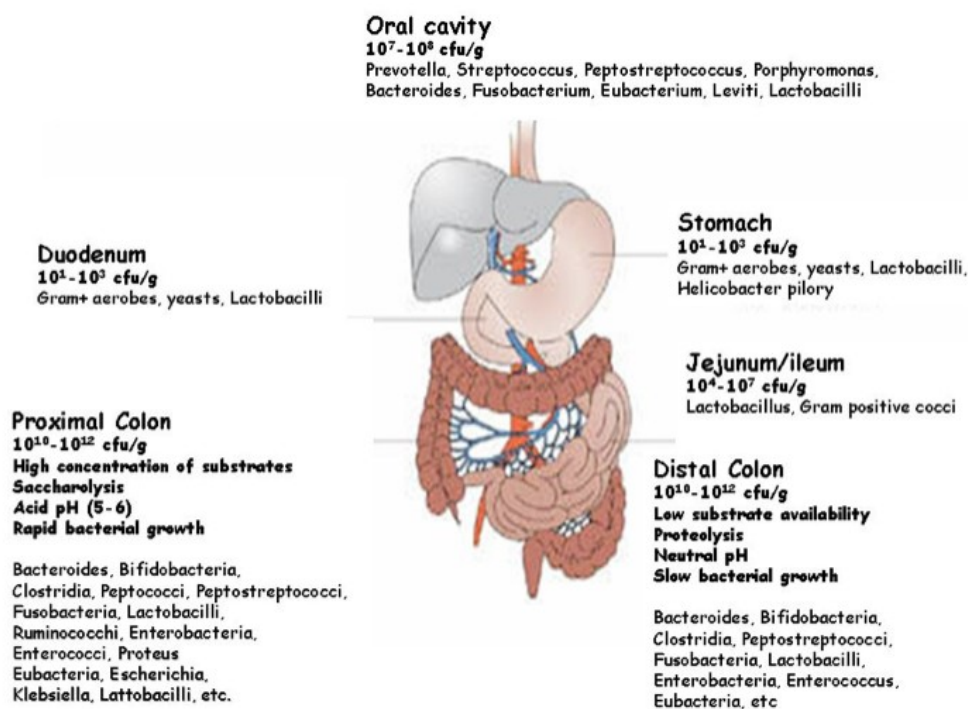


Figura 1. Distribuzione dei batteri lungo il tratto gastroenterico (da L. Santarpia et al. 2009).

La popolazione batterica è scarsa nello stomaco a causa del pH estremamente acido dell'ambiente gastrico ed è rappresentata soprattutto da Lattobacilli, Streptococchi e Lieviti; anche il duodeno ha una bassa popolazione microbica a causa dell'attività motoria propulsiva e del veloce tempo di transito che impediscono la colonizzazione stabile del lume e del pH sfavorevole generato dalle secrezioni biliari e pancreatiche. Dal digiuno all'ileo si osserva un graduale aumento nel numero delle specie (da 10^4 a 10^7), con un progressivo aumento dei batteri gram negativi e degli anaerobi obbligati.

Il colon contiene un complesso e dinamico ecosistema microbico con 10^{10} - 10^{12} cellule/grammo o millilitro di contenuto luminale, costituito in maggioranza da anaerobi, particolarmente abbondanti nel cieco e nel colon destro a causa della grande disponibilità di substrati e del favorevole ambiente per la crescita batterica (basso tempo di transito, disponibilità pronta di nutrienti, pH favorevole etc.) (5, 6).

Nel colon ci sono diverse centinaia di specie identificabili ed un numero significativo di specie che non possono essere coltivate con metodi convenzionali. La maggior parte dei batteri del colon sono *anaerobi non sporigeni* (7,8). Alla nascita, l'intestino è essenzialmente sterile; la colonizzazione del tratto gastrointestinale inizia subito dopo il parto con *Bacteroidetes* e *Bifidobacteria*, in caso di parto per via vaginale. In caso di nascita per parto cesareo la colonizzazione inizierà con l'alimentazione. Anche il tipo di allattamento (al seno materno o artificiale) condiziona il tipo di flora batterica intestinale. Il primo anno di vita è fondamentale per

l'attecchimento del microbiota, che si accresce e si seleziona tra il primo ed il quarto anno di età, evolvendosi poi fino all'età adulta in maniera variabile da individuo ad individuo (9-11).

Nei bambini tra 1 e 7 anni di età è presente un maggior numero di Enterobatteri rispetto agli adulti, con una maggiore abbondanza di generi *Bifidobacterium* e *Clostridium* (12, 13). Il microbiota intestinale adulto resta relativamente stabile nel tempo (14). In età geriatrica sia il numero che le differenze tra specie di *Bacteroidetes* si riducono ed aumentano i batteri del genere *Clostridium* (15).

Non è stato ancora definitivamente chiarito come l'ambiente e l'alimentazione possano influire sulla composizione del microbiota intestinale. Studi sul 16S rRNA hanno mostrato che nei bambini del Nord Europa vi è un maggior contenuto fecale di Bifidobatteri, mentre nelle feci di bambini del Sud Europa sono più rappresentati i *Bacteroidetes* e i Lactobacilli (16). Una notevole differenza è stata osservata tra bambini africani ed italiani, in quanto nelle feci dei bambini africani di villaggi rurali è stata osservata una maggiore presenza di *Prevotella*, *Xylanibacter* e *Treponema*, che possiedono enzimi per massimizzare l'estrazione di energia da xilani e cellulosa, presenti in gran quantità nella dieta povera in calorie ma ricca in fibre di questi bambini, con il risultato di una maggiore produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA) così da ottenere una fonte energetica aggiuntiva (17).

Uno studio di metagenomica su feci di individui provenienti da tre differenti continenti (*Europa, Nord America, Giappone*) ha permesso di identificare tre enterotipi non nazione- o continente-specifici. L'enterotipo I è ricco in *Bacteroidetes* e trae energia

principalmente dalla fermentazione di carboidrati e proteine. L'enterotipo II è ricco in *Prevotella* e *Desulfovibrio* che degradano le glicoproteine del muco presente sulla barriera mucosale intestinale. L'enterotipo III è ricco in *Ruminococcus* e *Akkermansia* e degrada mucine (18).

1.2 Funzioni del microbiota

La flora intestinale svolge funzioni essenziali nella tutela della salute, avendo un ruolo metabolico, strutturale e protettivo.

L'analisi molecolare ha dimostrato che i batteri commensali modulano l'espressione di geni coinvolti in molte importanti funzioni intestinali ed extraintestinali, incluso il metabolismo xenobiotico, la maturazione intestinale post-natale, l'assorbimento dei nutrienti, la fortificazione della barriera mucosale.

La fermentazione di residui alimentari non digeribili e di muco endogeno prodotto dall'epitelo costituisce la principale fonte di energia nel colon. L'endpoint metabolico è rappresentato dalla produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA: acetato, propionato, butirato in rapporto 60:25:15). Nel cieco e nel colon destro la fermentazione è molto intensa con una elevata produzione di SCFA, realizzazione di un pH acido (range 5-6) e una rapida crescita batterica. Per contro, il substrato nel colon distale è meno disponibile, il pH è quasi neutro, i processi putrefattivi diventano quantitativamente più importanti e l'attività della popolazione batterica è più bassa. La putrefazione è il metabolismo anaerobico di peptidi e proteine (elastina e collagene da fonti alimentari, enzimi

pancreatici, cellule epiteliali esfoliate e batteri lisati, etc.) che produce anch'essa SCFA ma, al tempo stesso, genera sostanze potenzialmente tossiche tra cui: ammoniaca, ammine, fenoli, tioli e indoli (19).

Gli SCFA hanno funzioni importanti nella fisiologia dell'ospite: 1) il butirrato è la principale fonte di energia per l'epitelio del colon; 2) l'acetato e il propionato sono metabolizzati dal fegato (propionato) o dai tessuti periferici, in particolare i muscoli (per l'acetato), e possono avere un ruolo come modulatori del metabolismo del glucosio e del colesterolo (20-22).

I batteri che producono SCFA sembrano influenzare il ciclo degli enterociti nel colon; in particolare il butirrato inibisce la proliferazione cellulare, stimola la differenziazione nelle linee cellulari neoplastiche epiteliali in vitro e sembra promuovere il ritorno da fenotipo neoplastico a non neoplastico (23-24).

La 7-deidrossilasi batterica partecipa nel colon alla deconiugazione di sali biliari, formando acidi biliari, primari e secondari, e in parte partecipa al loro riassorbimento enteroepatico (25).

I microorganismi del colon svolgono anche un ruolo nella sintesi di vitamine (B1, B2, B6, B12, PP, H, acido pantotenico e folico) e nell'assorbimento di calcio, magnesio e ferro, questo ruolo è ulteriormente migliorato dalla presenza di SCFA (26).

I batteri residenti sono una linea fondamentale di resistenza alla colonizzazione da parte di microrganismi esogeni. Essi regolano attivamente la produzione di nutrienti da parte dell'ospite tramite un meccanismo di feedback negativo, al fine di prevenire la disponibilità di nutrienti per potenziali patogeni (27, 28).

Inoltre, attraverso la produzione di sostanze antimicrobiche chiamate batteriocine, competono per i siti di attacco sull'orletto a spazzola delle cellule epiteliali intestinali così da inibire la crescita di potenziali concorrenti patogeni (29, 30).

La mucosa intestinale rappresenta l'interfaccia principale tra il sistema immunitario e l'ambiente esterno e la collaborazione tra l'ospite e i batteri sembra giocare un ruolo chiave nello sviluppo del sistema immunitario. Infatti, le placche di Peyer si sviluppano solo dopo l'esposizione alla flora batterica intestinale e risultano più abbondanti nell'ileo dove il numero dei batteri è più elevato (31-33). Inoltre, segnali dai batteri intestinali appaiono importanti per lo sviluppo della regolazione dei linfociti T helper di tipo 1 e 2 (34-36).

La prima molecola di un microrganismo commensale che ha dimostrato influenza benefica sulla risposta immunitaria è stato il polisaccaride capsulare A, prodotto dal *Bacteroides fragilis* (37). Acidi grassi a catena corta, come il butirrato, possono anche esercitare effetti immunomodulatori potenti, sopprimendo l'attivazione del fattore nucleare κB e/o agendo sui recettori accoppiati a G-protein (38, 39). Infine, mentre i batteri potenzialmente patogeni hanno un aspetto monomorfo, gli organismi commensali sono in grado di cambiare continuamente la loro antigenicità di superficie, sfuggendo così continuamente all'immuno-sorveglianza dell'ospite e contribuendo al mantenimento di una nicchia ecologica predominante nel tratto intestinale (40).

1.3 Funzioni metaboliche del microbiota

La flora intestinale sembra essere un fattore ambientale capace di influenzare il metabolismo e l'omeostasi energetica dell'ospite e sembra anche coinvolta nel controllo del peso corporeo attraverso l'estrazione di una quota supplementare di calorie dagli alimenti ingeriti. Gli esperimenti del gruppo di Gordon alla base di tale considerazione, sono partiti dalla scoperta che topi germ-free (axenici), sono più magri (40% di grasso corporeo in meno e 47% di grasso gonadico in meno) rispetto a topi che vivono con flora intestinale normale (convenzionalizzati), anche se questi ultimi hanno mangiato circa il 30% in meno rispetto ai topi axenici. La convenzionalizzazione di topi axenici con batteri provenienti dal cieco di topi magri, induce un drammatico aumento di peso corporeo (massa grassa corporea totale) entro due settimane, senza che vi sia stato un aumento nell'assunzione del cibo (41). Questo aumento della massa grassa risulta ancora più evidente quando la comunità microbica intestinale deriva da topi geneticamente obesi (ob-ob) (42).

Questi risultati sono verosimilmente dovuti alle differenze nel microbioma e/o nei metaboliti da esso derivati dei topi magri o obesi.

A questo proposito, Ley et al. hanno dimostrato che topi obesi presentano un maggior rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* nel microbiota del cieco rispetto a quello di topi magri (43). Per spiegare ciò, sono stati proposti vari meccanismi.

Il primo percorso suggerito dai ricercatori è che la convenzionalizzazione del microbiota intestinale raddoppia la

densità di capillari a livello dell'epitelio dei villi del piccolo intestino, contribuendo a raddoppiare l'assorbimento intestinale dei monosaccaridi (44).

Il secondo meccanismo è legato all'estrazione di energia dai componenti alimentari (polisaccaridi della fibra) non digeribili da parte degli enzimi umani, che vengono processati dagli enzimi batterici con produzione di monosaccaridi (successivamente assorbiti) e di acidi grassi a catena corta (SCFA) (attraverso la fermentazione); questi ultimi partecipano alla lipogenesi epatica *de novo* attraverso l'espressione di alcuni enzimi chiave come acetil-CoA carbossilasi (ACC) e acido grasso sintasi (FAS). Sia ACC che FAS sono controllati da due fattori nucleari: la proteina legante l'elemento responsivo ai carboidrati (ChREBP) e la proteina legante l'elemento responsivo agli steroli (SREBP-1) (45). La convenzionalizzazione di topi axenici promuove l'espressione epatica di mRNA per ChREBP e SREBP-1 inducendo la lipogenesi epatica *de novo* (41).

Inoltre il microbiota intestinale promuove il deposito di grasso anche attraverso un meccanismo che collega i trigliceridi circolanti alla soppressione dell'espressione intestinale di un inibitore della lipoprotein-lipasi (LPL) che è il FIAF, fattore adiposo indotto dal digiuno. Il FIAF normalmente inibisce l'attività della LPL, riducendo in tal modo il rilascio degli acidi grassi dai trigliceridi circolanti. Dopo la colonizzazione intestinale con microbiota, l'espressione del FIAF si riduce, con conseguente maggiore attività della LPL e maggiore deposito di grasso (41). In accordo con questa ipotesi, topi carenti in FIAF sono resistenti all'aumento di peso,

avvalorando il ruolo di tale fattore nella regolazione della lipogenesi. Tuttavia, uno studio recente ha suggerito che il FIAF non può essere il meccanismo fondamentale che lega il microbiota allo sviluppo di massa grassa, in quanto topi axenici tenuti a dieta ricca di grassi mostrano una maggiore espressione intestinale dell'mRNA per il FIAF, senza che vi siano grandi variazioni del FIAF circolante, rispetto ai topi conventionalizzati (46).

Un quarto percorso coinvolge gli SCFA quali substrati energetici e regolatori metabolici. Non sono chiari però i meccanismi alla base del ruolo degli SCFA sullo sviluppo della massa grassa e dell'aumento del peso corporeo (42, 47, 48). Infatti topi axenici nutriti con dieta occidentale ricca di grassi, pur avendo una pari assunzione di energia ed un equivalente contenuto energetico nelle feci rispetto a topi convenzionalizzati, sono resistenti all'obesità indotta dalla dieta. Inoltre, una dieta arricchita con specifici carboidrati non digeribili (prebiotici), pur determinando una maggiore produzione intestinale di SCFA, riduce l'aumento di peso corporeo, la massa grassa e l'eventuale sviluppo e gravità del diabete (49-52).

La complessità della flora batterica intestinale è stata studiata per individuare eventuali specie specifiche in rapporto al differente stato di nutrizione. Tuttavia, nonostante siano stati effettuati studi osservazionali in individui obesi (53) o anoressici (54), esistono risultati contrastanti. La somministrazione di inulina, ad esempio, ha dimostrato di aumentare il *Faecalibacterium prausnitzii* in volontari sani (55), e questi batteri hanno dimostrato a loro volta di ridurre l'infiammazione e il diabete in soggetti obesi (56). Invece, il

genere *Lactobacillus spp.*, appartenente al phylum *Firmicutes*, pare sia collegato all'obesità (54, 57-61). *Akkermansia muciniphila* è un batterio Gram-negativo recentemente identificato come batterio mucina-degradante che risiede nella mucosa dell'epitelio intestinale e rappresenta il 3-5% della comunità microbica in soggetti sani.

L'abbondanza di *Akkermansia muciniphila* pare sia inversamente correlata con il peso corporeo e il diabete di tipo 1 nei topi e nell'uomo, sebbene un recente studio metagenomico abbia trovato che alcuni dei geni appartenenti ad *Akkermansia muciniphila* siano abbondanti in soggetti con diabete di tipo 2 (62). Inoltre è stato osservato che la somministrazione di prebiotici (oligofruttosio) a topi geneticamente obesi aumenta la quantità di *Akkermansia muciniphila* di ~100 volte (63). Fino ad oggi, il dibattito rimane irrisolto, ma è probabile che alcune specie siano protettive contro l'obesità, mentre altre specie siano associate a un aumento di peso.

1.4 Microbiota ed infiammazione

L'estrazione di energia dalla dieta da parte di alcuni componenti del microbiota porta ad accumulo di grasso e a disordini metabolici, ma non è noto il meccanismo attraverso cui avviene l'interazione tra i batteri intestinali, le malattie metaboliche correlate all'obesità e l'insorgenza di infiammazione di basso grado. L'infiltrazione dei macrofagi negli organi (tessuto adiposo, muscoli e fegato) potrebbe promuovere la secrezione di fattori pro-infiammatori (64-67), tuttavia l'esatto ruolo di essi e la fonte e il tipo di fattori scatenanti

che attivano il sistema immunitario rimangono oggetto di dibattito (68).

Un eccesso di grasso nella dieta non solo aumenta l'esposizione sistemica ad acidi grassi liberi pro-infiammatori ma facilita lo sviluppo di endotossiemia metabolica per aumento dei livelli plasmatici di Lipopolisaccaride (LPS) (69). Il LPS può influenzare sia il metabolismo che il sistema immunitario, fornendo quindi la base all'ipotesi che il microbiota rappresenti una connessione funzionale tra vie metaboliche, immunità ed infiammazione (67).

Una serie di esperimenti ha dimostrato che i batteri intestinali possono avviare i processi infiammatori associati a obesità e resistenza all'insulina modulando i livelli plasmatici di LPS. Una dieta ricca in grassi sembra sia in grado di modificare il microbiota intestinale, rispetto a quello di topi nutriti con dieta normale. La dieta ricca di grassi aumenta di 2-3 volte i livelli plasmatici di LPS (endotossiemia metabolica) e induce marcata riduzione di *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Eubacterium rectale* e *Clostridium coccoides* (69). Uno studio su topi privi del corecettore CD14 del Toll-like (TLR receptor4-4) sottoposti a quattro settimane di dieta ad alto tenore di grassi ha mostrato che questi non aumentano di peso, né sviluppano resistenza all'insulina al contrario di quanto succede in topi normali (69). L'infusione cronica sottocutanea di LPS, che imita l'endotossiemia metabolica, induce infiammazione e resistenza insulinica e aumenta la massa sottocutanea e viscerale di circa il 30% e 40%, rispettivamente (69-71). Il ruolo del LPS del microbiota intestinale come fattore scatenante l'infiammazione di basso grado, il diabete di tipo 2 e la

resistenza all'insulina è stato successivamente studiato in topi geneticamente obesi e nutrizionalmente attraverso la modulazione specifica della composizione della flora intestinale utilizzando diete specifiche ed antibiotici (72). In primo luogo, la modifica della flora batterica intestinale con un trattamento antibiotico (polimixina B) protegge dallo sviluppo di massa grassa, dall'intolleranza al glucosio, dall'insulino-resistenza ed infiammazione, nonostante la somministrazione di una dieta ricca in grassi. Questa serie di studi suggerisce fortemente che una dieta ricca di grassi potrebbe non essere l'unica causa di obesità. Successivamente in topi obesi ob/ob ma privi del co-recettore CD14 per il LPS, tenuti a dieta ricca in grassi, si evidenzia protezione dall'obesità, dall'infiammazione e dalla resistenza insulinica (72). La relazione tra una dieta ricca di grassi, l'obesità, il diabete di tipo 2 e LPS è stata confermata anche nell'uomo. In soggetti sani, un pasto ricco di grassi induce un'endotossemia metabolica con LPS che aumenta fino a concentrazioni sufficienti per indurre un certo grado di infiammazione (73-80).

Inoltre, diversi studi hanno proposto che gli acidi grassi saturi possono promuovere infiammazione di basso grado ed insulino-resistenza attraverso un meccanismo TLR-4 dipendente (81, 82).

Gli acidi grassi sono coinvolti nella stimolazione del sistema immunitario, ma probabilmente è il LPS, che inizia la stimolazione del complesso TLR-4/CD14 e successivamente stimola TLR-2.

Diverse osservazioni supportano queste ipotesi:

- 1) la modifica della flora intestinale con antibiotici protegge i topi dall'obesità indotta dalla dieta e da disturbi metabolici, anche in presenza di recettori TLR-4/2 funzionanti (72);
- 2) topi knock-out per CD14 non sviluppano insulino-resistenza ed infiammazione, indotta da una dieta ricca in grassi, anche se i recettori TLR-4 e TLR-2 sono pienamente espressi (70);
- 3) i topi axenici alimentati con una dieta ricca di grassi sono resistenti allo sviluppo di infiammazione e insulino-resistenza, anche se essi ingeriscono completamente e assorbono il grasso ingerito (46).

Nel loro insieme, questi esperimenti suggeriscono che una cascata di segnali attivati da un meccanismo LPS/TLR-4/CD14-dipendente, a sua volta attiva l'espressione di TLR-2 per attivare la risposta infiammatoria del sistema immunitario innato.

Recenti studi hanno ipotizzato che lo stato di infiammazione di basso grado presente nell'obesità possa essere influenzato dalla variazione del controllo sulla barriera intestinale, derivante dall'interazione tra microbiota ed ospite (83, 84).

In condizioni fisiologiche, l'epitelio intestinale agisce come una barriera efficace e continua che impedisce la traslocazione batterica. Tuttavia, varie situazioni esogene e/o endogene sono associate ad alterazione della funzione protettiva. Tra i fattori riconosciuti specificamente che portano ad un'aumentata permeabilità intestinale (e quindi a promuovere endotossiemia metabolica), vi sono lo stress da immobilizzazione (85), il consumo di alcol e le radiazioni.

Vari meccanismi sembrano collegare i cambiamenti del microbioma intestinale nell'obesità con variazioni della funzione della barriera intestinale. L'utilizzo di prebiotici che modificano la flora batterica intestinale di topi geneticamente obesi è associata ad un miglioramento significativo della permeabilità intestinale misurata in vivo, per aumentata espressione dell'mRNA delle proteine delle giunzioni strette.

Una barriera intestinale migliore è stata correlata a ridotti livelli plasmatici portalì di LPS e a diminuzione di citochine epatiche e circolanti (86). Inoltre l'abbassamento dell'inflammazìone sistemica con prebiotici è correlato in modo significativo ad una riduzione marcata dello stress ossidativo ed infiammatorio nel tessuto epatico. Questi dati hanno fortemente suggerito che la modulazione della flora intestinale nei topi obesi con prebiotici potrebbe agire favorevolmente a migliorare la barriera intestinale ma i meccanismi sono ancora da chiarire.

Inoltre, è stato precedentemente trovato che i prebiotici aumentano l'altezza dei villi, la profondità delle cripte ed aumentano lo spessore dello strato della mucosa del digiuno e del colon (87). Ancora, non si può escludere l'impatto dei prebiotici sulla comunità microbica che si trova nella prima parte dell'intestino, anche se questa ipotesi resta da confermare.

1.5 Microbiota in differenti condizioni nutrizionali: obesità, anoressia nervosa, sindrome dell'intestino corto, chirurgia bariatrica

Obesità

L'obesità è una malattia cronica multifattoriale complessa.

Per classificarne la gravità, viene comunemente utilizzato l'Indice di Massa Corporea (IMC). Tale parametro si ottiene dividendo il peso in Kg per il quadrato dell'altezza espressa in metri. In relazione all'IMC, la WHO, distingue gli individui in: Sottopeso ($BMI < 18.5 \text{ kg/m}^2$); Normopeso ($18.5 < BMI < 24.9$); Sovrappeso ($25 < BMI < 29.9$); Obesità di I grado o moderata ($30 < BMI < 34.9$); Obesità di II grado o severa ($35 < BMI < 40$); Obesità di III grado ($BMI > 40$).

Attualmente in Europa il 17% degli abitanti è affetto da obesità ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) (88), mentre negli USA circa i due terzi della popolazione adulta è in sovrappeso, la metà è francamente obesa (89, 90).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha coniato il termine "Globesity" (global-obesity) per definire la diffusione su scala planetaria del problema. Anche in Italia (dati ISTAT 2002) la percentuale di persone in sovrappeso è elevata (35-40% della popolazione adulta) ed il 9% della popolazione risulta obesa.

L'accumulo eccessivo di grasso degli individui obesi è frutto della mancata omeostasi energetica dell'organismo, legata al difficile bilanciamento tra fattori ambientali, comportamentali, psicologici,

genetici e neuroormonali (91). L'obesità, in una visione dinamica del problema, può essere considerata come la deviazione patologica dalla fisiologica evoluzione della massa grassa durante la vita (crescita, pubertà, menopausa, invecchiamento) (92). Sicuramente l'alimentazione e l'attività fisica rappresentano i principali fattori condizionanti il bilancio energetico, ma il tessuto adiposo non rappresenta un sito passivo di accumulo di energia, potendo dialogare con cervello ed organi periferici attraverso numerosi segnali. Pertanto, i fattori ritenuti influenti sul problema obesità sono molteplici.

L'obesità genetica multifattoriale è il risultato dell'azione indipendente di numerosi singoli geni diversi; ma fattori genetici da soli non spiegano il significativo aumento di prevalenza dell'obesità. Le sindromi genetiche legate a patologie di un singolo gene associate ad obesità sono molto numerose ma poco frequenti ("Sindrome di Prader Willi", "Sindrome di Laurence-Moon-Bardet-Bied", etc.).

I fattori ambientali e comportamentali che incidono sul determinismo del fenotipo obeso sono diversi ed agiscono direttamente oppure attraverso la modulazione dell'espressione dei diversi geni coinvolti nell'obesità (ad esempio il grado di metilazione del DNA, che ne condiziona l'espressione, è influenzato da eventi epigenetici legati ai fattori ambientali attivi in età perinatale) (93). I fattori ambientali sono: fattori economici e sociali come la disponibilità di cibo e lo status sociale che varia tra i diversi contesti etnici, differenti segnali visivi ed olfattivi, abitudini alimentari e presenza di eventuali disordini del comportamento

alimentare, perdita di sonno, variazioni ormonali, presenza di inquinanti ambientali come derivati della diossina e bisfenili (94); questi ultimi agiscono come fattori perturbanti il sistema endocrino-metabolico e sono correlati anche ad un peggioramento dell'assetto lipidico ed epatico.

Negli ultimi anni inoltre ha assunto sempre maggiore rilievo il ruolo dell'interazione tra microbiota intestinale e il metabolismo dell'individuo ospite (95). Per esempio da numerosi autori è stata messa in evidenza una sostanziale differenza nella composizione del microbiota intestinale di individui obesi rispetto ai magri. I tre “*phyla*” più rappresentati nella flora batterica intestinale sono i *Bacteroidetes*, i *Firmicutes* e gli *Archaea*. Alcuni autori hanno riferito una riduzione della proporzione dei *Bacteroidetes* negli obesi rispetto ai soggetti magri ed agli anoressici (96, 97). Dall'analisi del 16S-rRNA di 154 individui obesi è emersa una riduzione della variabilità delle specie presenti nella flora intestinale, con riduzione dei *Bacteroidetes* ed aumento invece di *Bifidobacterium spp.* del phylum *Actinobacteria* (98). In un lavoro basato su identificazione tramite metodo colturale, negli obesi rispetto ad individui normopeso, è stata evidenziata una riduzione dei *Bacteroidetes* e di *Clostridium spp.* dei *Firmicutes*, ed un aumento degli *Enterococchi* dei *Firmicutes* stessi (99). Il monitoraggio dei due principali phyla di batteri della flora intestinale, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* in obesi tenuti a dieta ipocalorica, evidenzia una bassa concentrazione di *Bacteroidetes*, che aumentano progressivamente mano a mano che il paziente perde peso, indipendentemente dall'introito energetico; viceversa i

Firmicutes, che risultano in proporzione aumentati, si riducono quando il paziente viene messo a regime dietetico dimagrante (100). Tali dati non trovano conferma in un lavoro in cui, al contrario, i *Bacteroidetes* risultano aumentati negli obesi e nei soggetti in sovrappeso, mentre *Ruminococcus spp.* dei *Firmicutes* risulta ridotto (101). Il sequenziamento del 16S rDNA in obesi gravi, controlli normopeso e pazienti operati di by-pass gastrico, ha mostrato negli obesi, un aumento delle *Prevotellaceae*, sottogruppo dei *Bacteroidetes*, ed un aumento delle *Coriobacteriaceae* del phylum degli *Actinobacteria* (102). Altri studi sulla variazione del microbiota in seguito a trattamento dietetico ed esercizio fisico, eseguiti con la tecnica “Fluorescent in situ ibridization” (FISH), mostrano un aumento nella proporzione di *Bacteroidetes* e *Prevotella coccoides* ed una riduzione di *Firmicutes* (*Clostridium histolyticum*, *Eubacterium rectale* e *Clostridium coccoides*); tale riduzione correla con l’entità del calo ponderale (103). Nella stessa popolazione tale risultato è stato confermato anche con analisi quantitativa con PCR (Polimerase Chain Reaction); inoltre, in seguito al dimagrimento, si è osservata una riduzione di *Bifidobacterium spp.* degli *Actinobacteria* (104). Altri studi, viceversa, non hanno trovato correlazione tra la proporzione di *Bacteroidetes* e l’obesità o il tipo di dieta.

Nel tentativo di comprendere se la composizione del microbiota dell’infanzia possa determinare aumento di peso nella crescita, Kalliomaki ha monitorato il peso, l’altezza ed il microbiota in differenti mesi di vita e a 7 anni. I bambini divenuti obesi a 7 anni non hanno presentato riduzione nella concentrazione di

Bacteroidetes rispetto ai coetanei normopeso (105). Il calo ponderale in bambini precedentemente obesi non determinava differenze nella quantità di *Bacteroidetes*, rispetto ai bambini normopeso, ma mostrava una diminuzione di *Roseburia rectale*, un genere produttore di butirrato appartenente ai *Firmicutes* (106). Studi recenti hanno evidenziato un aumento dei Lattobacilli negli obesi rispetto ai soggetti magri e agli anoressici (96) e in pazienti obesi affetti da diabete di tipo 2 (91). I Lattobacilli risultano ridotti in un gruppo di adolescenti obesi in seguito a calo ponderale successivo ad una dieta restrittiva (107). Million in un recentissimo studio (2012) ha dimostrato l'associazione tra *Lactobacillus reuteri* e l'obesità (97). Invece studi sugli *Actinobacteria* mostrano una riduzione significativa di *Bifidobacterium spp.* nel microbiota dei soggetti obesi e tale alterazione, per la quale vi è consenso in tutti gli studi, sembra quella maggiormente implicata sia nell'obesità che in una eventuale terapia anti-obesità.

Gli *Archaea* metanogenici, a cui appartiene il *Methanobrevibacter smithii*, sembrano legati all'obesità in quanto capaci di aumentare l'efficienza della fermentazione, rimuovendo l'idrogeno dall'intestino. Vi sono studi contrastanti, nei quali il *Methanobrevibacter smithii* risulta aumentato negli obesi rispetto ai soggetti magri (102) oppure ridotto (96, 97, 101). Sembra però confermata la tesi secondo cui il *Methanobrevibacter smithii* sia correlato al microbiota dei soggetti magri proprio in relazione alla sua capacità di aumentare la resa energetica degli alimenti ingeriti, derivandone da essi una maggiore quota di SCFA attraverso il processo della fermentazione. Da tutti gli studi elencati si evince

che non vi sono evidenze conclusive che associno l'obesità o la magrezza ad uno specifico tipo di microbiota.

Anoressia nervosa

L'anoressia nervosa (AN) è una grave e complessa malattia da disturbo della condotta alimentare che di solito inizia nell'adolescenza ed è caratterizzata da un'alimentazione che ha l'intento di mantenere basso il peso corporeo (108). Secondo il Manuale di Statistica e Diagnosi dei Disturbi Mentali (DSM-IV) i criteri diagnostici per AN sono il rifiuto di mantenere il peso corporeo al di sopra del minimo ideale in rapporto a età e altezza (peso corporeo inferiore all'85 % di quello atteso) e la presenza dei seguenti sintomi: alterata percezione del peso e della propria immagine corporea, costante paura di diventare grassi e amenorrea nelle femmine postpubere (109). L'anoressia nervosa presenta due varianti: restrittiva (AN-R) e bulimica (che comprende meccanismi di compensazione come l'uso di lassativi, diuretici o vomito) (AN-BP) (109). Il tipo restrittivo è caratterizzato da un apporto calorico molto ristretto, associato ad intenso esercizio muscolare. Il tipo bulimico è caratterizzato da episodi di perdita di controllo, con abbuffate soggettive e meccanismi compensatori. L'anoressia presenta complicanze croniche legate alla malnutrizione, fino alla cachessia ed è spesso accompagnata da disturbi psichiatrici come depressione, disturbi d'ansia e disturbo ossessivo-compulsivo (109). Altre complicazioni includono la compromissione della funzione mestruale, bradicardia, ipotensione ortostatica, basso livello di potassio plasmatico e perdita di capelli. La perdita di peso si

verifica, almeno inizialmente, soprattutto a livello del tessuto adiposo e vi è una significativa riduzione del metabolismo energetico. Le anomalie metaboliche dei pazienti anoressici non sono chiare. Gli studi sulla sensibilità all'insulina nei pazienti anoressici hanno dato risultati contrastanti. Il metabolismo del glucosio insulino-mediato è risultato normale (110), aumentato (111) o diminuito (112). Sicuramente gli anoressici mostrano normale “flessibilità metabolica”, cioè una buona capacità da parte dei muscoli di passare dall'utilizzo dei lipidi all'utilizzo insulino-mediato del glucosio, cosa che indica una buona sensibilità all'insulina (110). Sono state studiate numerose sostanze tra cui alcuni enterormoni ed adipocitokine per chiarire la patogenesi dell'AN, ma nessuno di questi fattori riesce a spiegare chiaramente il comportamento anoressico e la duratura perdita di peso in questi pazienti. Recentemente l'anoressia è stata associata anche ad aumentato rischio cardiovascolare, probabilmente dovuto ad aumento del colesterolo plasmatico e soprattutto della quota di colesterolo LDL, a causa della mobilitazione di questo dai depositi a scopo energetico. L'aumento delle LDL plasmatiche si associa inoltre a riduzione degli ormoni tiroidei e di estrogeni (E2) (113).

Nei pazienti affetti da anoressia si assiste a modifica dei livelli di adipocitochine circolanti, degli ormoni intestinali e dei fattori di crescita, che potrebbero dipendere dal tipo e dalla durata della malattia e dal grado di malnutrizione.

Lo studio della flora batterica intestinale, basato sul confronto tra microbiota di magri e di obesi, ha ipotizzato differenze anche nella flora intestinale degli anoressici. Uno studio di Armougom (2009),

ha esaminato campioni di feci di soggetti obesi, normopeso ed anoressici con analisi genetica quantitativa con PCR. I *Firmicutes* erano quantitativamente simili nei tre gruppi; i *Bacteroidetes* e i Lactobacilli erano significativamente aumentati negli obesi rispetto ai magri e agli anoressici, mentre *Methanobrevibacter smithii*, risultava più numeroso negli anoressici rispetto agli altri due gruppi, ma era significativa la differenza con i magri. La differenza significativa con i magri può essere spiegata dal tentativo negli anoressici di mantenere un bilancio energetico positivo, producendo calorie extra con la fermentazione, dato l'introito di calorie dalla dieta estremamente scarso.

Gli *Archaea* metanogenici sono importanti in quanto rimuovono l' H_2 in eccesso prodotto nell'intestino dalla fermentazione, favorendo quindi la produzione di energia da parte di quest'ultima (114). La carica microbica di *Methanobrevibacter smithii* è risultata aumentata in soggetti obesi dimagriti in seguito a by-pass gastrico (115).

Sindrome dell'intestino corto

La sindrome dell'intestino corto (SIC) è una condizione di malassorbimento successiva ad un'ampia resezione intestinale. I fattori prognostici includono l'età, la lunghezza dell'intestino residuo, la presenza o assenza della valvola ileocecale, etc.. In particolare la valvola ileo-cecale impedisce il reflusso di batteri dal colon al piccolo intestino e regola il passaggio di sostanze nutritive al colon. Quest'ultima funzione ha il ruolo di prolungare il tempo di transito intestinale: aumentando il tempo di contatto tra mucosa e

nutrienti, si massimizza l'assorbimento di sostanze nutritive, fluidi ed elettroliti (116).

Nella normale fisiologia e anatomia, la proliferazione batterica nell'intestino tenue è controllata dall'acidità gastrica, dalla normale attività anterograda peristaltica nel piccolo intestino e dalla valvola ileocecale nell'ileo distale. Quando uno o più di questi meccanismi è compromesso nei pazienti con SIC, si può verificare un peggioramento del malassorbimento intestinale con conseguente malnutrizione.

Nel caso di resezione dell'ileo terminale, l'arrivo nel colon degli acidi biliari non riassorbiti dal circolo enteroepatico e la loro conseguente deconiugazione da parte dei batteri colici porta ad infiammazione e danno della superficie assorbitiva con conseguente peggioramento del malassorbimento e squilibrio idroelettrolitico. In caso di rimozione della valvola ileocecale, che fisiologicamente impedisce il reflusso di materiale enterico e di batteri dal colon, si può verificare una contaminazione retrograda del tenue con conseguente diarrea e malassorbimento intestinale (117).

Il controllo della iperproliferazione batterica e dell'eventuale contaminazione retrograda del tenue con l'utilizzo di cicli di specifici antibiotici a tropismo intestinale sembra avere un ruolo chiave nella gestione dei pazienti con SIC (118).

Chirurgia bariatrica

La Sleeve gastrectomy o gastrectomia laparoscopica a manica (SG) è una procedura chirurgica efficace per il trattamento dell'obesità grave e viene eseguita con sempre maggiore frequenza, sia in

Europa che negli Stati Uniti, oltre al bendaggio gastrico regolabile laparoscopico (LAGB), al bypass gastrico Roux-enY (LRYGBP), e la diversione bilio-pancreatica con switch duodenale (BPD-DS). La SG è un intervento puramente restrittivo (**Figura 2**), nato per pazienti obesi ad alto rischio (119-120). La perdita di peso dopo SG varia dal 35% al 72% del peso iniziale (121-124). La risoluzione di comorbidità come il diabete, l'iperlipidemia, l'ipertensione e l'apnea notturna a 12-24 mesi dopo SG è percentualmente almeno simile a quella di altre procedure restrittive, con complicanze inferiori rispetto al By-pass e alla diversione B.P. (125). Diversi studi riferiscono percentuali di complicanze che variano da 0% a 24% con un grado di mortalità globale dello 0,39%. La SG presenta molteplici vantaggi rispetto ad altre procedure bariatriche come la mancanza di un corpo estraneo, la conservazione del piloro, l'assenza di dumping syndrome. Il vantaggio più importante del procedimento è la possibilità di essere eseguita in pazienti con BMI > 60 kg/m², nel tentativo, riducendo il peso, di affrontare la chirurgia malassorbitiva con un minor rischio chirurgico. Inoltre, tale intervento può essere utilizzato in pazienti nei quali è controindicato il bypass gastrico, come quelli con storia di ulcera, anemia cronica o insufficienza renale.

Scopo della SG è la riduzione del volume gastrico al 10% del volume medio dello stomaco e l'aumento della pressione intragastrica, così da attivare precocemente i recettori di stiramento ed i meccanocettori che trasmettono segnali di sazietà al sistema nervoso centrale (SNC). Normalmente, durante l'ingestione di alimenti si ha rilasciamento attivo del fondo gastrico, con aumento

di volume, senza aumento della pressione intragastrica (125). La SG non solo riduce la capacità gastrica totale, ma agisce anche sulla distensibilità gastrica, determinando un'elevata pressione intraluminale e di conseguenza la sensazione precoce di sazietà.

Gli interventi di chirurgia bariatrica, modificando l'anatomia e la fisiologia del tratto gastroenterico, modificano la flora batterica intestinale. Variazioni del microbiota interagiscono con il metabolismo del paziente operato, influenzandone il dimagrimento. Uno studio condotto in tre adulti dopo by-pass gastrico ha mostrato una significativa diminuzione dei *Firmicutes*, con aumento dei *Gammaproteobacteria* (102). Uno studio su 30 soggetti con obesità patologica, seguiti per 6 mesi dopo by-pass gastrico ha mostrato un rapido aumento del rapporto *Bacteroidetes/Prevotella* dopo il by-pass (rapporto ridotto nell'obesità preoperatoria) e una diretta correlazione tra la quantità di *Faecalibacterium prausnitzii* e gli indici infiammatori (99). Ciò è in accordo con gli studi che mostrano una percentuale più bassa di *Bacteroidetes* nei soggetti obesi rispetto ai magri (126). Studi di correlazione che utilizzano modelli statistici, dimostrano che vi è una forte associazione tra specie batteriche, parametri metabolici e composizione corporea. Dopo la perdita di peso, maggiore è la riduzione della massa grassa e dei livelli circolanti di leptina, più aumenta la proporzione *Bacteroides/Prevotella* nelle feci. Al contrario, la presenza di *Faecalibacterium prausnitzii* è più bassa nei soggetti con diabete ed è inversamente associata ai marcatori infiammatori, prima e durante il follow-up dell'intervento chirurgico, indipendentemente dalle variazioni della dieta. *Faecalibacterium prausnitzii* mostra effetti

anti-infiammatori, perché produce metaboliti in grado di bloccare l'attivazione di fN-kB e la secrezione di mediatori proinfiammatori (126).



Figura 2. Intervento di Sleeve Gastrectomy.

1.6 Microbiota ed epatosteatosi

La NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) rappresenta un ampio spettro di condizioni clinico-istologiche che vanno dall'accumulo di grasso intracellulare epatico alla steatoepatite nella quale è presente una componente necroinfiammatoria, fino alla cirrosi ed al carcinoma epatico. Negli ultimi anni la patogenesi della NAFLD è stata legata alla sindrome metabolica. Le biopsie epatiche di pazienti obesi mostrano steatosi nell'80% dei casi, e di

questi nel 20-30% vi è fibrosi (127). Fattori di rischio per la NAFLD sono l'obesità, la sindrome metabolica, il diabete mellito tipo II e la dislipidemia (128). Si è soliti classificare la NAFLD come: 1) primaria (dovuta a condizioni associate ad insulinoresistenza come i tre fattori di rischio sopra citati); 2) secondaria (- a farmaci come amiodarone, estrogeni, corticosteroidi, nifedipina, diltiazem; - a procedure chirurgiche come resezioni del piccolo intestino e by-pass digiuno-ileale; - a nutrizione parenterale nel caso in cui le miscele contengano troppi glicidi, miscele non bilanciate di lipidi e scarsa colina; - a tossici ambientali e chimici, a malattia di Weber Christian); 3) idiopatica, cioè da causa incerta (eccessiva crescita dei batteri intestinali, emocromatosi, epatite cronica HCV correlata, etc.).

Da alcuni anni anche il microbiota intestinale sembra influire sulla patogenesi della NAFLD, sia attraverso la produzione di LPS e quindi la stimolazione della cascata delle citochine come il $\text{TNF}\alpha$, che attraverso la produzione in anaerobiosi di acetaldeide da piruvato, con successiva riduzione di essa ad etanolo (129). Tale ipotesi è sostenuta dall'evidenza che l'uso di antibiotici come la polimixina B ed il metronidazolo, o l'uso di probiotici, possano migliorare l'epatosteatite sia nel ratto che nell'uomo. In pazienti sottoposti a by-pass gastrico a scopo bariatrico è stato ipotizzato che il miglioramento della NAFLD possa essere legato anche a variazioni del microbiota.

2. Scopo dello studio

Il nostro studio si propone di esaminare possibili differenze nella composizione della flora batterica intestinale e nel contenuto di acidi grassi fecali a catena corta (SCFA) prodotti dall'attività di fermentazione della stessa, in quattro gruppi di pazienti differenti per lo stato di nutrizione (anoressici e obesi) o per il tipo di intervento chirurgico ricevuto (chirurgia bariatrica = chirurgia gastrointestinale “alta”; Sindrome dell'Intestino Corto = chirurgia gastrointestinale “bassa”) ed in un gruppo controllo. Di ciascun gruppo è stato inoltre valutato il regime dietetico seguito, sia con diario che con inchiesta alimentare, così da identificare possibili influenze della dieta sulla composizione della flora intestinale e sulla produzione di SCFA.

3. Pazienti e Metodi

3.1 Popolazione in studio

Sono stati studiati 84 soggetti suddivisi in 5 gruppi:

- 1) n.18 pazienti (3M – 15F, età media 22 ± 4 anni, BMI $14,1\pm 1$ kg/m²) con *anoressia nervosa* di tipo restrittivo (AN), non in fase di rialimentazione e con peso stabile da alcuni mesi. Tale gruppo per l'incidenza della malattia è costituito da soggetti prevalentemente di sesso femminile (15 F e 3 M).
- 2) n.13 pazienti (5M – 8F, età media 38 ± 17 anni, BMI 25 ± 7 kg/m²) con *Sindrome dell'Intestino Corto* (SIC), in Nutrizione Parenterale Domiciliare;
- 3) n.21 pazienti (8M – 13F, età media 39 ± 9 anni, BMI 36 ± 8 kg/m²) *operati di Sleeve Gastrectomy* (SG). I soggetti del gruppo SG sono stati tutti operati da almeno un anno, hanno perso in media il 20% del loro peso pre-intervento (media circa 30 kg) e attualmente presentano un peso stabile;
- 4) n.16 pazienti (9M – 7F, età media 37 ± 11 , BMI 45 ± 7 kg/m²) *obesi* (OB);
- 5) n.16 (6M – 10F, età media 38 ± 14 , BMI 22 ± 3 kg/m²) *controlli normopeso* (CNP).

La popolazione in studio è stata reclutata tra i soggetti di peso stabile afferenti agli Ambulatori dell'Area Centralizzata di Nutrizione Clinica, Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico “Federico II” di Napoli.

Tutti i soggetti arruolati hanno firmato il consenso informato per la partecipazione allo studio.

Per ciascun soggetto, dopo la raccolta dell'anamnesi e l'esame obiettivo, sono state rilevate le misure antropometriche e sono stati effettuati prelievi di sangue a digiuno per la valutazione dello stato di nutrizione.

E' stato inoltre prelevato un campione di feci per la valutazione qualitativa e quantitativa della flora batterica intestinale e del contenuto in acidi grassi fecali a catena corta (SCFA).

A ciascun soggetto è stato richiesto di compilare un diario alimentare per un periodo di 4 settimane ed è stata inoltre praticata un'inchiesta alimentare da personale dietistico dedicato. Per ciascun soggetto è stato misurato il dispendio energetico a riposo, in condizioni standardizzate (metabolismo basale) con calorimetria indiretta e valutata la composizione corporea con bioimpedenziometria (BIA).

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad ecografia epatica, con metodo standardizzato, per l'identificazione di eventuale steatosi epatica e sua quantizzazione.

3.2 Parametri antropometrici

L'altezza è stata misurata mediante uno stadiometro con una sensibilità di 0,1 cm e il peso corporeo con bilancia meccanica con una sensibilità di 0,1 Kg con il soggetto a piedi nudi e avente indosso abiti leggeri; dalla misurazione di peso e altezza è stato

calcolato il BMI (Kg/m^2); la circonferenza vita è stata misurata con un metro a nastro a livello delle creste iliache.

3.3 Calorimetria indiretta

Il metabolismo a riposo dei soggetti in studio è stato misurato con calorimetria indiretta per 30 minuti mediante il calorimetro Vmax 29n, Sensor-Medics. La calorimetria indiretta valuta il dispendio energetico a riposo attraverso la misura del consumo di O_2 (VO_2) e della produzione di CO_2 (VCO_2). Il quoziente respiratorio (QR), ottenuto dal rapporto tra VO_2 e VCO_2 , fornisce indicazioni circa la miscela metabolica utilizzata dal soggetto. Per il calcolo del metabolismo basale è stata utilizzata la formula di De Weir ottenendo quindi una media rispetto al periodo intero di misura. Durante le misurazioni, il soggetto è in posizione supina, a digiuno da almeno 12 ore, dopo una notte di riposo, nessun esercizio fisico o pasto eccessivo o abuso di sostanze eccitanti nelle 24 ore precedenti la misura; durante la determinazione vanno garantite condizioni di termoneutralità ($20\text{-}24\text{ }^\circ\text{C}$), inoltre è necessaria l'assenza di qualsiasi fattore di eccitazione fisica o psichica.

3.4 Bioimpedenziometria (BIA)

L'analisi bioimpedenziometrica permette di valutare la composizione corporea mediante misure elettriche. In particolare viene valutata la TBW (Total Body Water = acqua totale corporea), somma dell'acqua intracellulare (ICW = IntraCellular Water) e dell'acqua extracellulare (ECW = ExtraCellular Water): in

condizioni fisiologiche normali esse rappresentano rispettivamente circa il 60% e 40% dell'acqua corporea totale nell'adulto. La BIA fa riferimento ad un modello di composizione corporea di tipo bicompartimentale: la FFM (*free fatty mass*), in condizioni fisiologiche normali, costituita nell'adulto dal 73% di acqua e la FM (*fatty mass*) considerata completamente anidra anche se in realtà può avere fino al 5% di acqua. Da un punto di vista elettrico, la FFM, ricca in acqua ed elettroliti, è un buon conduttore elettrico, mentre la FM non è capace di condurre elettricità.

L'impedenza (Z) ha una parte resistiva (la *resistenza* R) e una parte legata ai fenomeni energetici di accumulo (la *reattanza* X).

Nel corpo umano sano la resistenza contribuisce per ben il 98% all'impedenza e la reattanza al 2%. Il rapporto tra X ed R è detto fattore Q e la sua tangente è detta *angolo di fase*. L'angolo di fase è espresso in gradi e rappresenta il ritardo che la corrente elettrica alternata a 50Hz incontra nell'attraversare un conduttore. Nell'organismo umano le membrane cellulari fungono da condensatori (trattengono cioè una certa quantità di corrente elettrica), per tale motivo l'angolo di fase sarà direttamente proporzionale alla quantità di membrane cellulari.

Essendo una metodica indiretta, la BIA ha bisogno di equazioni specifiche per trasformare il dato elettrico in massa corporea. L'analisi bioimpedenziometrica è capace di definire la ripartizione dell'acqua corporea tra spazi intra ed extracellulari. I parametri BIA utilizzati per tale tipo di analisi sono: l'angolo di fase e la multifrequenza.

L'apparecchio AKERN BIA 101 (BIA 101, Akern, Firenze, Italy) è costituito da 4 elettrodi di cui 2 iniettori e 2 sensori. Il soggetto è supino, non a contatto con superfici metalliche. In genere si usa una corrente alternata a 50 kHz di debole intensità (400 microampere), del tutto innocua. Gli elettrodi iniettori vengono posizionati sulla superficie dorsale della mano e del piede, mentre gli elettrodi sensori vengono posizionati tra le prominenze del radio e dell'ulna e tra il malleolo mediale e laterale della caviglia. Agli elettrodi vengono collegati dei fili conduttori, attraverso cui viene fatta circolare la corrente che, attraversando le strutture corporee, subirà un calo della sua intensità dovuta all'impedenza associata alle strutture corporee; il segnale risultante (ovvero la risposta in termini di intensità elettrica) viene trasmesso ad un apparecchio trasduttore che raccoglie i dati traducendoli in misure corporee.

Le misurazioni sono state ottenute in stato post-assorbitivo (la mattina a digiuno), ad una temperatura ambientale di 22-24°C, dopo aver svuotato la vescica e dopo essere rimasti in posizione supina per almeno 20 minuti.

La FFM e la FM sono state valutate utilizzando l'equazione predittiva sviluppata da Kushner (130).

Tutte le misurazioni della BIA sono state calcolate come media dei valori ottenuti su entrambi gli emilati. L'angolo di fase (PA) è stato ottenuto dal rapporto reattanza/resistenza: $PA \text{ (gradi)} = \arctan(XC/Res)$.

3.5 Questionario sulle abitudini alimentari

Per la registrazione delle abitudini alimentari è stato usato un questionario validato dall'Università di Perugia, Istituto di Scienza dell'Alimentazione (131) che si basa sulla registrazione per ricordo degli alimenti assunti abitualmente e di recente, mediante frequenza di consumo. Si chiede al soggetto quante volte al giorno o alla settimana o al mese, consuma un determinato cibo o una serie di cibi. Il questionario dà dunque un'idea delle abitudini alimentari più che dei consumi effettivi.

3.6 Ecografia epatica

L'ecografia epatica è stata eseguita da due indipendenti operatori all'oscuro dei dati clinici dei pazienti. È stato utilizzato un apparecchio Esaote Mpx Biomedica con sonda convessa 3.5-MHz e una sonda lineare ad alta frequenza (7-13 MHz). La steatosi epatica è stata valutata semiquantitativamente su una scala da 0 a 3 (0:assente; 1: lieve; 2: moderata; 3: grave). La steatosi è stata classificata secondo Saverymuttu et al. (132) sulla base di anormali echi intensi e di alto livello dal parenchima epatico, dalla differenza rene-fegato nell'ampiezza dell'eco, dalla penetrazione dell'eco nella porzione profonda del fegato e dalla chiarezza della struttura dei vasi sanguigni del fegato (133, 134).

3.7 Indagini di laboratorio

Le indagini ematochimiche (azotemia, glicemia, creatininemia, emocromo, QPE, transaminasi, colesterolo totale, HDL-colesterolo, trigliceridi, fibrinogeno, ferritina, insulinemia, colinesterasi) sono state determinate con metodi di laboratorio di routine presso il DAS Medicina di Laboratorio - Servizio Analisi - Azienda Ospedaliera Universitaria “Federico II” di Napoli. L’indice di insulinoresistenza è stato calcolato utilizzando l’indice HOMA.

3.8 Raccolta campioni di feci

Per la raccolta delle feci sono stati utilizzati contenitori specifici muniti di cucchiaino interno. I campioni di feci sono stati raccolti dai pazienti e dai controlli in quantità pari ad una noce evitando di mescolare le feci con le urine. Il campione è stato conservato in luogo fresco (2-8°C) e consegnato il prima possibile in laboratorio per un massimo di 24 ore. Tutti i pazienti hanno sospeso l’eventuale terapia antibiotica per almeno una settimana. Successivamente alla consegna, i campioni sono stati congelati entro 4 ore a -20 °C e conservati per le successive indagini gascromatografiche, saggio PCR real-time e metodo colturale.

3.9 Determinazione degli acidi grassi a catena corta fecali (SCFA)

Analisi Gas Cromatografica con Rilevatore a ionizzazione di fiamma (FID Flame Ionization Detector)

I campioni di feci sono stati pesati (1 g), sospesi in 5 ml di acqua distillata e agitati con agitatore orizzontale per 5 minuti. Il campione è stato acidificato con HCl (5 M) fino ad un pH~2 e successivamente centrifugato (4000 rpm x 20 min). Sono stati prelevati 980 µl di acqua fecale e aggiunti a 20 µl di Acido Metacrilico (2.5 mMol/ ml). Il contenuto in acidi grassi a catena corta (acido acetico, acido propionico e acido butirrico) è stato determinato mediante gas cromatografo Hewlett Packard 5890 Series II con rilevatore a ionizzazione di fiamma iniettando 1 µl di campione in colonna capillare Supelco SPBTM 30m x 0.25mm x 0.25mm. I risultati (**Figura 3**) sono stati elaborati mediante un integratore Hewlett Packard 3396 Series II (135).

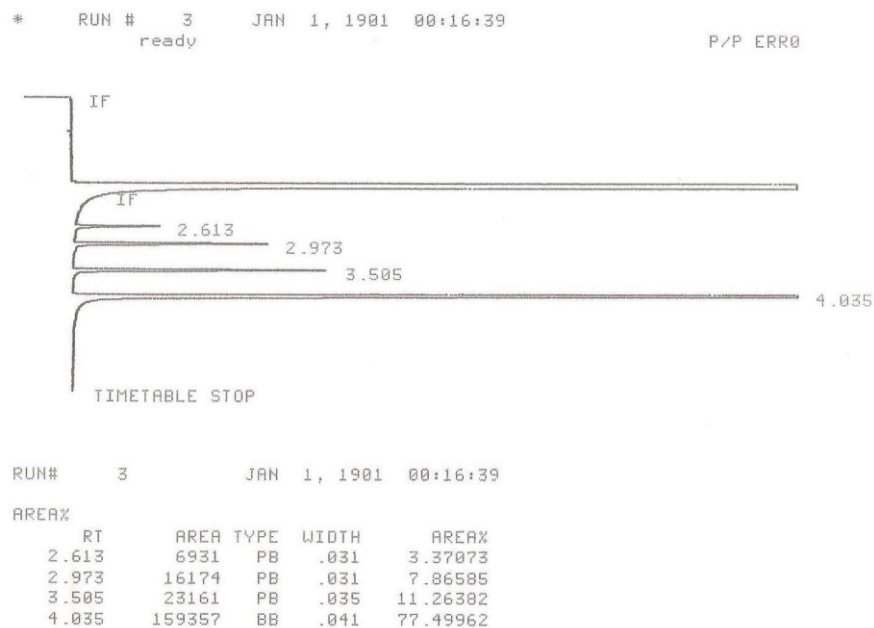


Figura 3. Cromatogramma di un singolo campione: il picco a 2.6 è l'acido acetico, a 2.9 è l'acido propionico, a 3.5 è l'acido butirrico.

3.10 Analisi della flora batterica intestinale

3.10.1 Saggio PCR real-time

Preparazione del campione e estrazione del DNA

I campioni di feci sono stati congelati e conservati immediatamente a -20°C . Al momento dell'analisi i campioni sono stati scongelati e il DNA è stato estratto secondo le indicazioni del kit QIAamp DNA stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). La concentrazione del DNA è stata determinata con uno spettrofotometro Nanodrop-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA).

Saggi PCR quantitativa Real-Time

I geni target, le sequenze dei primer e delle sonde (lifetech, applied biosystems), e le dimensioni dell'amplicone per due saggi PCR real-time usati in questo studio sono riassunti in **Tabella 1** (54). Le sonde e i primers MGB dei phyla *Bacteroidetes* e *Firmicutes* sono stati progettati sulla base del DNA genomico dei barcode precedentemente descritti (136). I primers e le sonde del genere *Lactobacillus spp.* usati in questo studio sono stati precedentemente riportati (137). Le sonde e i primers *M. smithii* (**Tabella 1**) sono stati fatti sintetizzare secondo quanto riportato (138). Nei campioni sono stati inseriti 5 pmol di primers e sonde marcate con FAM o VIC. Un totale di 5 µl di DNA estratto dalle feci è stato diluito 1/10, 1/100, o 1/1000. Le diluizioni sono state portate a un volume finale di 25 µl. I cicli di amplificazione PCR real-time per la determinazione dei *Bacteroidetes* comprendono 95°C per 15 min e 45 cicli (95°C 30 s, 48°C 45 s, 72°C 1 min). Per le determinazioni dei *Firmicutes* e *Lactobacillus spp.*, i cicli di amplificazione comprendono 95°C per 15 min e 45 cicli (95°C 30 s, 60°C 1 min). La determinazione e quantificazione di *Lactobacillus spp.* è stata eseguita come precedentemente riportato (54). *Bacteroidetes* e *Firmicutes* sono stati quantificati usando un plasmide sinettico che è stato costruito come precedentemente descritto (54).

Target phylum	Target gene	Amplicon length (bp)	Primer and probe sequences
<i>Lactobacillus</i>	Tuf	90	FP: TACATYCCAACHCCAGAACG RP: AAGCAACAGTACCACGACCA Probe: AAGCCATTCTTRATGCCAGTTGAA
<i>Firmicutes</i>	16S rRNA	179	FP: GTCAGCTCGTGTCTGTA RP: CCATTGTAKYACGTGTGT Probe: GTCAANTCATCATGCC
<i>Bacteroidetes</i>	16S rRNA	184	FP: AGCAGCCGCGGTAAT RP: CTAHGCATTTACCGCTA Probe: GGGTTAAAGGG
<i>M. smithii</i>	16S rRNA	123	FP: CCGGGTATCTAATCCGGTTC RP: CTCCCAGGGTAGAGGTGAAA Probe: CCGTCAGAATCGTTCAGTCAG

FP indicates the forward primer, and RP indicates the reverse primer.
doi:10.1371/journal.pone.0007125.t001

Tabella 1. Sistema PCR Real-Time per *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (da Armougom 2009).

Plasmide di quantificazione

La curva standard per l'analisi quantitativa è stata costruita utilizzando diluizioni seriali di un plasmide contenete frammenti chimerici corrispondenti alle sequenze specifiche dei 3 gruppi batterici ricercati (*Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *M. smithii*).

La lunghezza del frammento chimerico (**Figura 4**) è di 485 bp.

agcagccgcggaatACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATT-
 TATTgggtttaagggAGCGTAGGTGGACTGGTAAGTCAGTTGT-
 GAAAGTTTGC GGCTCAACCGTAAAATTGCAGTTGATAC-
 TGTCAGTCTTGAGTACAGTAGAGGTGGGCGGAATTG-
 TGGTgtagcggtgaaatgcttag**gtcagctcgtgctga**GATGTTGGGTT-
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGC-
CATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGT-
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACgtcaaatcatcatg-
ccCCTTATGACCTGGGCT **acacacgtgctacaatgg** ccgggtatcta-
ccggttcGCGCCCTAGCTTTCGTCCCTCAccgtcagaatcgtccagtcag-
ACGCCTTCGCAACAGGCGGTCCTCCCAGGATTACAGA-
Attcacctctaccctgggag.

Figura 4. Frammento chimerico (da Armougom 2009).

La sequenza target per i *Bacteroidetes* è indicata in stile normale, la sequenza target per i *Firmicutes* è indicata in stile grassetto, e la sequenza target per *M. smithii* è indicata in stile sottolineato. Le sequenze primer sono indicate in minuscolo e sottolineate; le sequenze probe sono indicate in minuscolo e in corsivo (54).

3.10.2 Metodo culturale

Un 1 gr di materiale fecale prelevato dal centro del campione è stato passato in terreno di arricchimento BBL Enriched Thioglycollate Medium (8ml), con Vitamin K1 e Hemin, effettuando diluizioni seriali, da 10^{-1} a 10^{-7} . Per la ricerca dei batteri aerobi sono stati utilizzati i seguenti terreni di coltura: Macconkey Agar n°3, Mannitol Salt Agar e Columbia Agar Base supplementato con sangue di montone (Oxoid). Sono stati piastrati 0.1ml di campione

dalle diluizioni 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} e poi incubati in aerobiosi a 37°C per 24-48 h. Per la ricerca dei batteri anaerobi sono stati utilizzati i terreni di coltura a base di sangue di montone (5%): CDC Anaerobe Agar, CDC Anaerobe Blood Agar con Phenylethyl Alcohol (diluizioni: 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-7}), Schaedler Kanamycin-Vancomycin Agar, Schaedler CNA Agar (diluizioni 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6}) e terreni selettivi: Bacteroides Bile Esculin Agar con Amikacin (per la ricerca dei *Bacteroides spp.*), LBS agar (per la ricerca dei Lattobacilli) e Bifidobacterium Agar modified (per la ricerca dei Bifidobatteri) (diluizioni 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6}) (BD). Le piastre sono state incubate in cappa per anaerobi (miscela: 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂) ad una temperatura di 37°C. Dopo 24 – 48 ore le colonie sono state subcoltivate e incubate in doppio: in anaerobiosi ed in incubatore a CO₂ per distinguere i batteri anaerobi obbligati da quelli facoltativi (139, 140, 141). I microrganismi sono stati identificati seguendo procedure standard e mediante successivi test biochimici standardizzati e miniaturizzati: Api 20A, Api20E, ApiStrep, ApiStaph (BioMerieux) (141-143).

4. Analisi statistica

I dati ottenuti dalle varie indagini effettuate sono stati informatizzati ed analizzati con programma statistico SPSS versione 11.0. Le variabili continue sono state espresse come media \pm deviazione standard. Per il confronto di variabili continue è stato utilizzato il t-test, mentre per il confronto di variabili categoriche è stato utilizzato il test X^2 (chi-quadro); per l'analisi delle differenze tra gruppi è stato utilizzato il test ANOVA. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0.05$.

5. Risultati

Le caratteristiche dei soggetti in studio sono descritte in **Tabella 2**.

La popolazione dei soggetti esaminati è omogenea per età, tranne che per gli AN, la cui patologia ha insorgenza in età più precoce rispetto alle altre e che dunque sono in media più giovani rispetto agli altri gruppi.

Gruppo	N°	M/F	Età (anni)±ds	Peso (Kg)±ds	IMC (Kg/m ²)±ds
SIC	13	5/8	38 ±17	61 ±19	25 ±7
SG	21	8/13	39 ±9	97 ±27	36 ±8
AN	18	3/15	22 ±4 *	32 ±7	14 ±1
OB	16	9/7	37 ±11	129 ±23*	45 ±7
CNP	16	6/10	38 ±14	59 ±8	22 ±3

* $p < 0.05$

Tabella 2. Caratteristiche degli 84 soggetti in studio suddivisi nei rispettivi gruppi di appartenenza.

Come atteso, il peso degli obesi risulta significativamente superiore a quello di tutti gli altri gruppi, eccetto per il gruppo SG.

L'epatosteatosi ha mostrato una prevalenza del 46% negli OB, 45% dei pazienti operati di SG, 21% dei pazienti affetti da SIC, 20% dei CNP e 10% degli AN.

Dall'analisi dei dati relativi agli introiti, si deduce che l'inchiesta alimentare risulta più affidabile nella definizione dei consumi di ciascun gruppo rispetto al diario. Dal confronto delle due metodiche di raccolta è infatti risultato che gli obesi tendono ad omettere l'assunzione di determinati alimenti e/o relative reali quantità, mentre per gli AN si verifica il contrario. Pertanto nell'analisi dei dati si terrà conto solo dell'inchiesta alimentare: per quanto riguarda l'**introito calorico totale**, è emerso che il gruppo AN assume meno calorie rispetto ad OB ($p=0,05$) e CNP ($p=0,023$).

Per le **proteine** vi è differenza tra SG e OB ($p=0,05$) e tra AN e OB ($p=0,05$). Per i **glicidi** vi è differenza tra gli AN, CNP e OB ($p<0.05$), e tra gli SG, i CNP e gli OB ($p<0,005$). Per la **fibra totale** vi è differenza tra SG, CNP e OB ($p=0,05$).

5.1 Microbiota intestinale

L'analisi della flora batterica intestinale, eseguita sia mediante saggio PCR real-time che con metodo colturale, ha permesso l'identificazione e la quantificazione dei batteri presenti nei campioni di feci raccolti sia a livello di phyla (*Bacteroidetes* e *Firmicutes*) che di genere (*Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*) nonché di specie (*Methanobrevibacter smithii*, *Clostridium perfringens*, *Lactococcus garvieae*, *Bacteroides intestinalis*, etc.).

Relativamente ai *Bacteroidetes* la tipizzazione e quantificazione mediante saggio PCR real-time ha mostrato differenze statisticamente significative tra il gruppo SG e il gruppo SIC ($p=0,028$) (**Figura 5**);

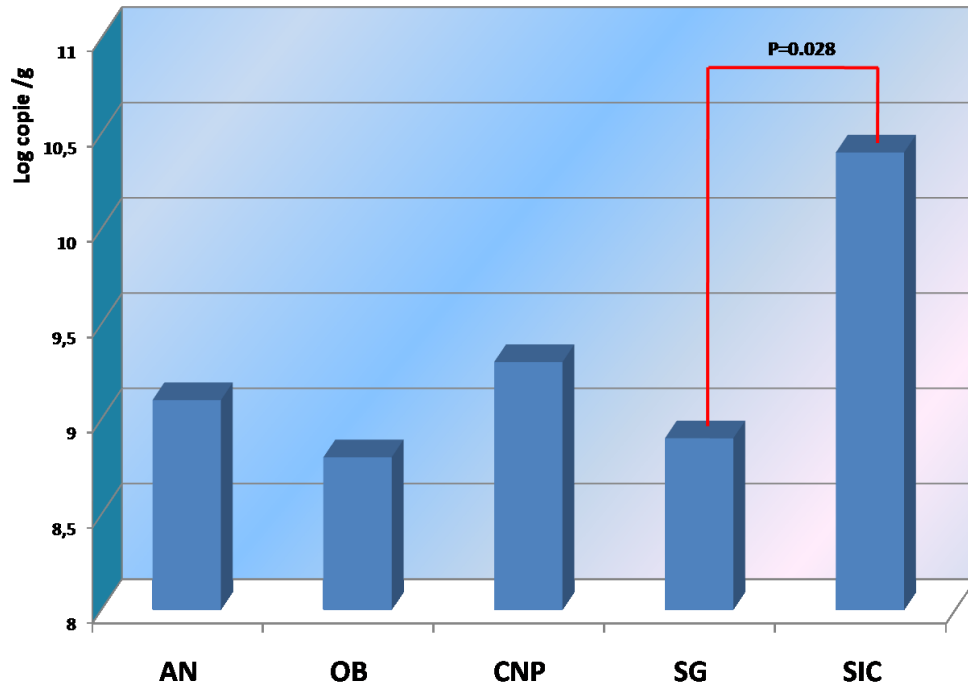


Figura 5. Quantificazione dei *Bacteroidetes*, mediante saggio PCR real-time, nei cinque gruppi di soggetti in studio.

mentre per i *Firmicutes* è stato il metodo colturale ad evidenziare differenze statisticamente significative ($p=0,042$) tra gli stessi gruppi di pazienti (SG e SIC) (**Figura 6**).

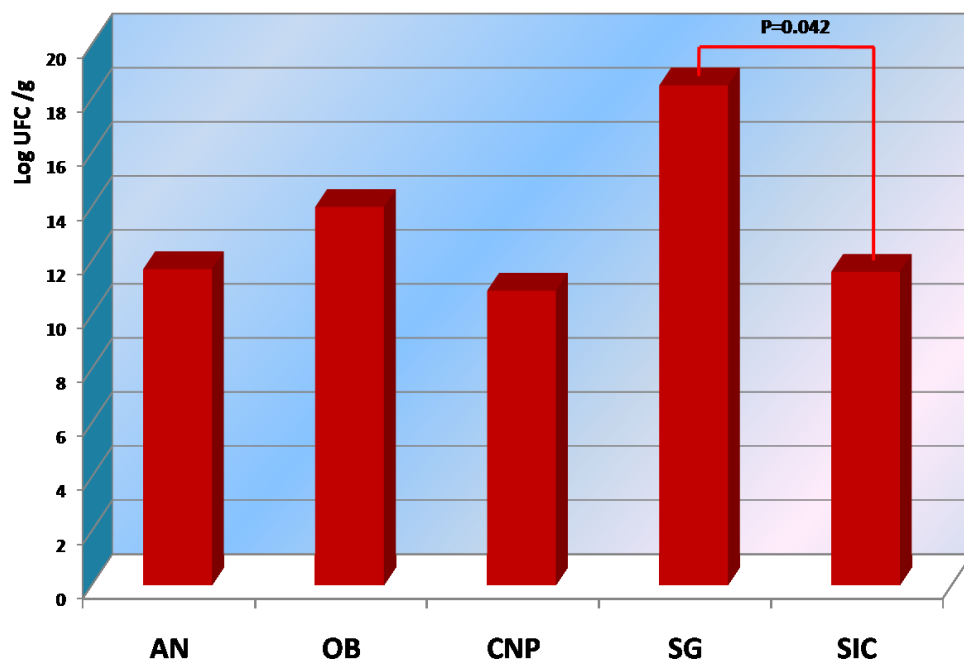


Figura 6. Quantificazione dei *Firmicutes*, mediante metodo colturale, nei cinque gruppi di soggetti in studio.

La ricerca a livello di *Bifidobacterium spp.* è stata eseguita soltanto con il metodo colturale ed ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra il gruppo SIC e il gruppo CNP ($p=0,019$) (**Figura 7**).

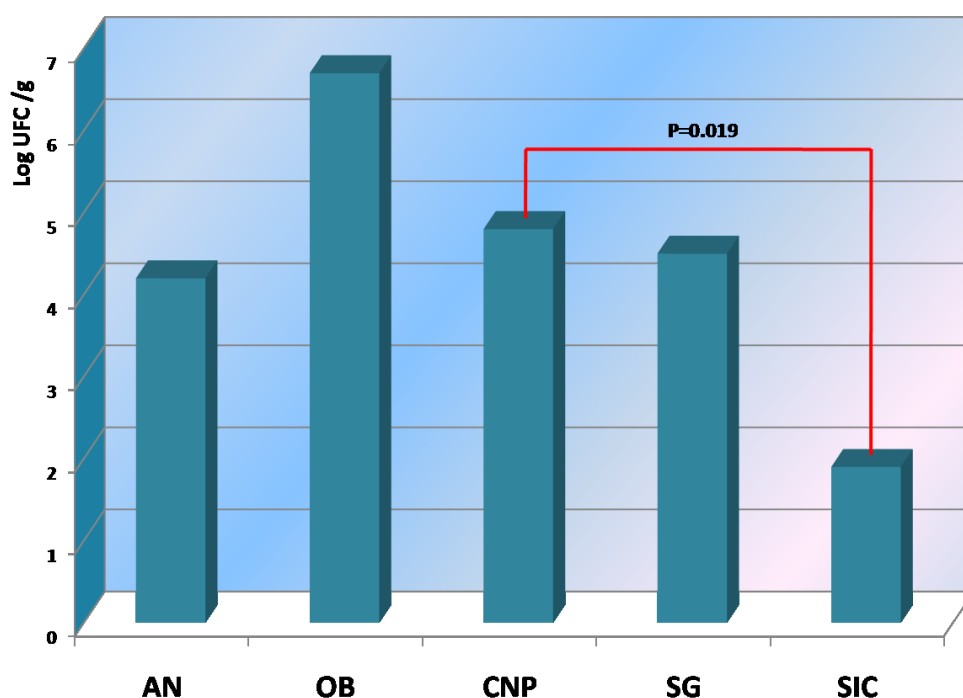


Figura 7. Quantificazione di *Bifidobacterium spp.*, mediante metodo colturale, nei cinque gruppi di soggetti in studio.

L'analisi statistica dei dati ottenuti dalla ricerca di *Lactobacillus spp.*, eseguita sia mediante saggio PCR real-time che metodo colturale (**Figure 8 e 9**), e dalla ricerca di *Methanobrevibacter smithii*, attraverso saggio PCR real-time (**Figura 10**), non ha rilevato alcuna differenza significativa tra i gruppi di pazienti studiati.

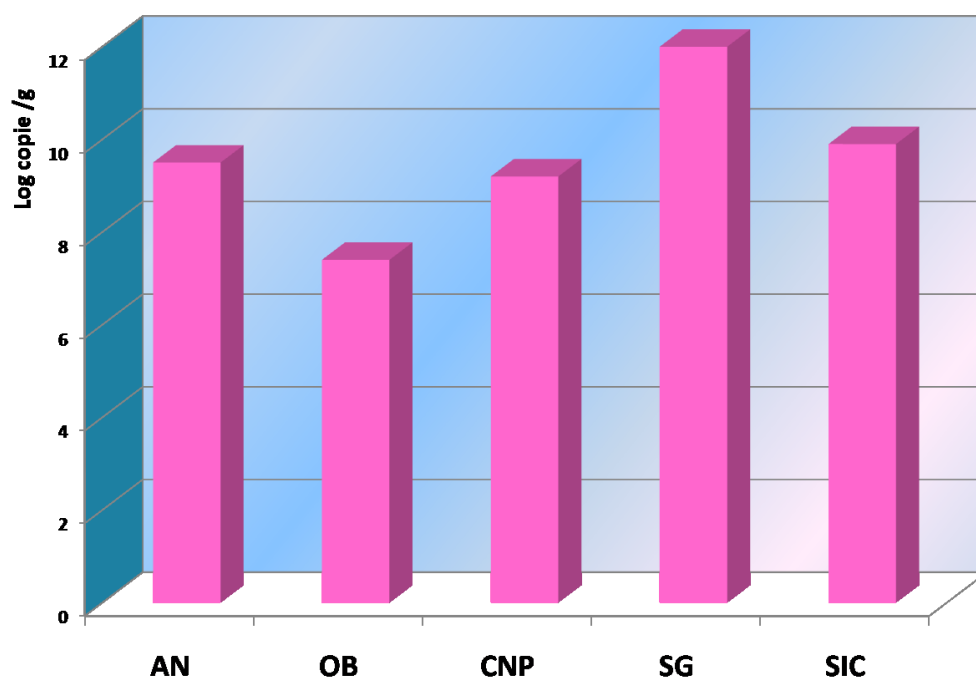


Figura 8. Quantificazione di *Lactobacillus spp.*, mediante saggio PCR real-time, nei cinque gruppi di soggetti in studio.

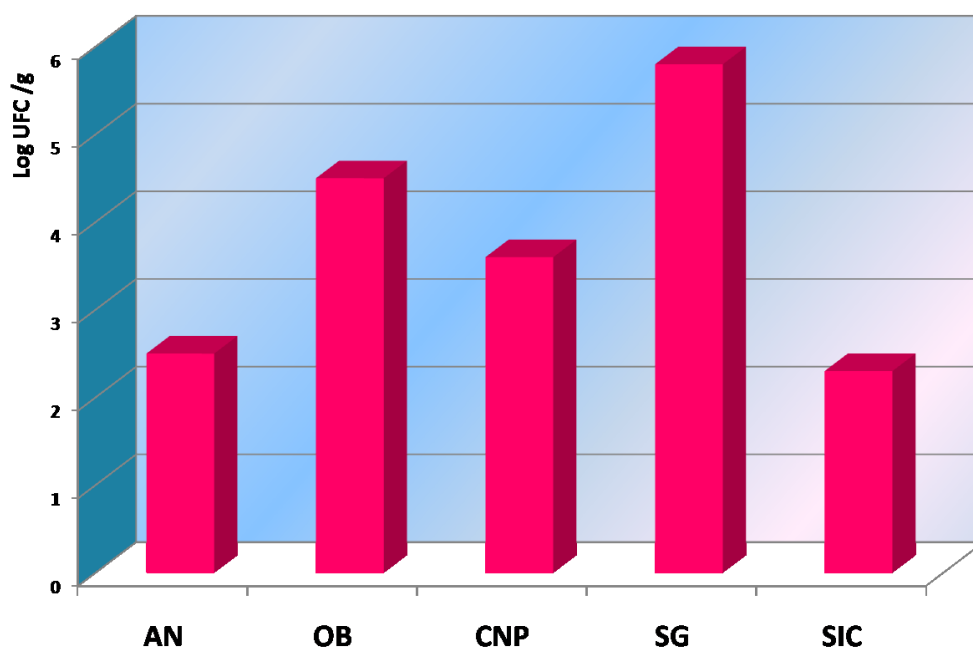


Figura 9. Quantificazione di *Lactobacillus spp.*, mediante metodo colturale, nei cinque gruppi di soggetti in studio.

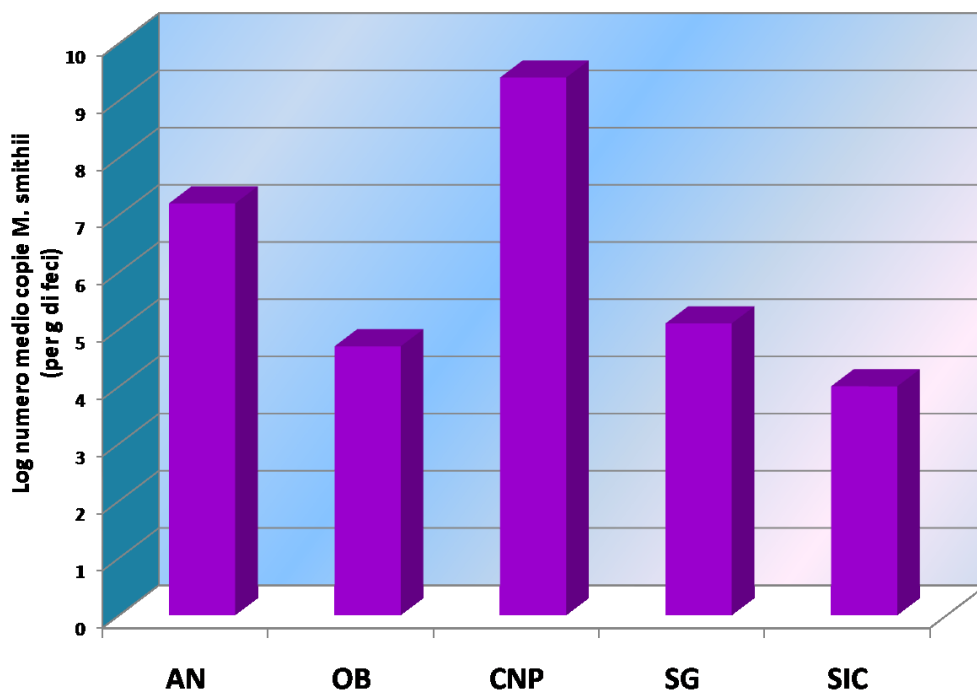


Figura 10: Quantificazione di *Methanobrevibacter smithii*, mediante saggio PCR real-time, nei cinque gruppi di soggetti in studio.

Nel gruppo AN risulta che i *Firmicutes* (metodo colturale) hanno una forte correlazione inversa con le proteine ($r = -0,990$; $p=0,001$) e diretta con gli oligosaccaridi ($r = 0,973$; $p = 0,005$) introdotti con la dieta. Nel gruppo SG è stata osservata una correlazione inversa tra i Bifidobatteri, le calorie totali ($r = -0,753$; $p = 0,031$), le proteine ($r = -0,738$; $p = 0,037$) e i lipidi ($r = -0,844$; $p = 0,008$) assunti con la dieta.

Nel gruppo SIC è stata osservata: una forte correlazione inversa tra i *Bacteroidetes* (metodo colturale) e le calorie totali ($r = -0,999$; $p=0,002$); correlazione diretta tra Lattobacilli e oligosaccaridi ($r=0,973$; $p = 0,027$); correlazione diretta tra *Methanobrevibacter*

smithii e oligosaccaridi ($r = 0,972$; $p = 0,028$); correlazione diretta tra *Firmicutes* e oligosaccaridi ($r = 0,972$; $p = 0,028$).

5.2 Acidi grassi a catena corta fecali

La **Figura 11** mostra i risultati ottenuti dall'analisi del contenuto in acidi grassi a catena corta (SCFA), effettuata con analisi gascromatografica sui campioni di feci raccolti.

Non emergono differenze nei vari gruppi quando si considera il contenuto in SCFA totali.

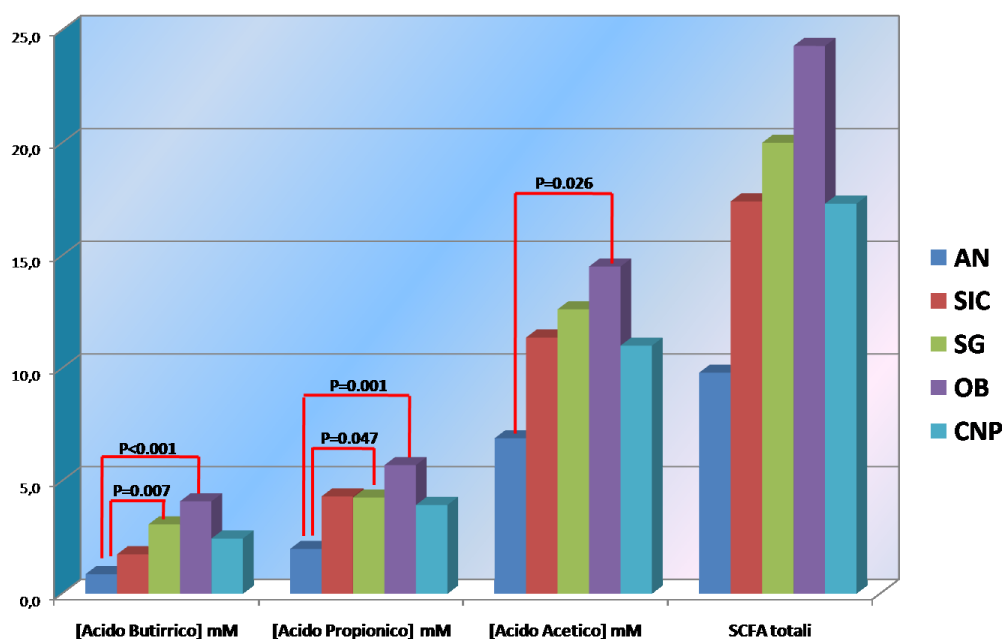


Figura 11. Concentrazioni medie degli acidi grassi a catena corta fecali (SCFA) nei cinque gruppi di soggetti in studio.

Per l'**acido butirrico** emerge una differenza statisticamente significativa tra il gruppo AN e il gruppo OB ($p<0,001$) e tra il gruppo AN e il gruppo SG ($p=0,007$). Anche per l'**acido propionico** vi è una differenza statisticamente significativa tra gli stessi gruppi di pazienti e precisamente tra il gruppo AN e il gruppo OB ($p=0,001$) e tra il gruppo AN e il gruppo SG ($p=0,047$). Invece per l'**acido acetico** vi è una differenza statisticamente significativa soltanto tra il gruppo AN e il gruppo OB ($p=0,026$).

Da una successiva analisi di correlazione tra il contenuto in acidi grassi a catena corta fecali e i dati relativi agli introiti alimentari (inchiesta alimentare) è emerso che soltanto nel gruppo degli AN esiste una forte correlazione diretta tra gli SCFA e la dieta. In particolare per l'acido butirrico c'è una correlazione diretta con le calorie totali ($r=0,917$; $p=0,010$), con i glicidi ($r=0,974$; $p=0,001$) e gli amidi ($r=0,943$; $p=0,005$) assunti con la dieta mentre per l'acido propionico c'è una correlazione diretta con le calorie totali ($r=0,821$; $p=0,045$).

In riferimento agli SCFA è emersa, nel gruppo SG, una correlazione diretta tra l'acido butirrico e i Bifidobatteri ($r=0,847$; $p=0,004$).

6. Discussione

L'analisi della flora batterica intestinale è stata eseguita sia mediante saggio PCR real-time che con metodo colturale.

L'utilizzo di tecniche colturali tradizionali è stato il primo metodo per caratterizzare un ecosistema batterico attraverso la conta di colonie che crescono su un particolare terreno di crescita. Le colonie risultanti, che rappresentano i microrganismi vitali coltivabili, vengono poi identificate con test biochimici. Pertanto, l'isolamento e la coltivazione su uno specifico terreno di coltura permettono la caratterizzazione solo di microrganismi in grado di crescere e moltiplicarsi su quel particolare mezzo di crescita, con la possibilità di trascurare la presenza di altre componenti microbiche vitali per le quali però non è adatto quello specifico mezzo di coltura (144). Furrie (2006) ha illustrato i vantaggi e gli svantaggi dell'uso di metodiche coltura-dipendenti per lo studio del microbiota intestinale umano. I vantaggi del metodo colturale sono i bassi costi (se confrontati con le nuove tecniche di ricerca), e la possibilità di eseguire indagini biochimiche e fisiologiche sui ceppi isolati. Nonostante questi aspetti positivi, le tecniche classiche mostrano notevoli svantaggi in quanto richiedono tempi lunghi e laboriosi di analisi, la necessità di processare in tempi brevissimi i campioni da esaminare e inoltre sono fortemente influenzate dal terreno e dalle condizioni di crescita (145).

Un ulteriore problema associato al metodo colturale è che, come si è osservato in numerosi studi microbiologici su feci umane, per la natura del metodo utilizzato, le conte colturali rivelano una predominanza di batteri anaerobi gram-positivi (146). Infatti, la

maggior popolazione facilmente isolata dai campioni di feci è composta da batteri che crescono rapidamente su terreni di crescita classici, ricchi in nutrienti e a temperature mesofile (20-45°C), mentre queste stesse condizioni di crescita risultano poco favorevoli per specie batteriche anaerobiche e per batteri intestinali che crescono preferenzialmente in condizioni di microaerofilia. La concentrazione di queste ultime popolazioni viene dunque sottostimata.

Nuovi approcci coltura-indipendenti sono stati sviluppati e applicati per meglio analizzare la composizione della flora batterica intestinale umana (145). Questo ha permesso l'identificazione di un gran numero di nuovi taxa batterici e per molti di questi non sono ancora disponibili terreni di crescita selettivi.

La PCR real-time è una tecnica coltura-indipendente ad elevata sensibilità e specificità ed estrema rapidità di esecuzione che permette di identificare specie viventi e non viventi e quindi di ampliare le conoscenze della flora batterica intestinale.

Nota la sequenza del DNA da amplificare, vengono utilizzati primers e probe capaci di riconoscere sequenze specie-specifiche del cromosoma batterico. Si estrae il DNA batterico dal campione in esame e si procede all'amplificazione e quantificazione simultanea del DNA mediante l'utilizzo di colorazioni fluorescenti che si intercalano con il DNA oppure con sonde ad ibridazione (probe oligonucleotidici), specifiche per il frammento amplificato, marcate con molecole fluorescenti.

I risultati ottenuti mediante PCR real-time, confrontati con altre nuove tecniche quantitative, hanno mostrato una maggiore precisione numerica (145).

Nei 4 gruppi di pazienti e nel gruppo di controllo presi in esame, sono emerse alcune differenze statisticamente significative nella composizione della flora batterica intestinale per le quali non sempre sono noti il significato ed il possibile risvolto clinico, ma che in questa fase preliminare di studio è opportuno segnalare come utile spunto di riflessione. Ad esempio emerge una differenza statisticamente significativa per *Bacteroidetes* e *Firmicutes* nei due gruppi di pazienti che hanno ricevuto uno o più interventi chirurgici sul tratto gastrointestinale (gruppo SG e gruppo SIC). La SG, effettuata a scopo bariatrico, è una chirurgia di tipo restrittivo che ha come obiettivo quello di tubulizzare la sacca gastrica per garantire un precoce senso di sazietà e ridurre dunque la quantità di alimenti ingeriti, consentendo dunque il calo ponderale nel tempo dei soggetti obesi.

I pazienti con SIC hanno invece subito interventi chirurgici di ampia resezione di tenue, ed in alcuni casi anche di parte o dell'intero colon, danneggiati da varie patologie, quali vasculopatia cronica intestinale con occlusione dei vasi mesenterici superiori, morbo di Crohn, ischemia per volvolo, etc..

Anche la differenza riscontrata nei livelli fecali di *Bifidobacterium spp.* tra il gruppo SIC e i controlli, al momento, non trova in letteratura una valida motivazione.

Dalle nostre valutazioni emergono inoltre dati isolati su alcune correlazioni tra assunzione di specifici nutrienti, la flora batterica

intestinale e la produzione di acidi grassi fecali. Per esempio, è emerso che nel gruppo AN i *Firmicutes* hanno una forte correlazione inversa con le proteine e diretta con gli oligosaccaridi introdotti con la dieta. Nel gruppo SG è stata osservata una correlazione inversa tra *Bifidobacterium spp.*, le calorie totali, le proteine e i lipidi assunti con la dieta. Nel gruppo SIC è stata osservata una forte correlazione inversa tra i *Bacteroidetes* e le calorie totali, etc.. Al momento non esistono dati in letteratura a supporto dei risultati emersi dal nostro studio; è certamente chiara la necessità di ulteriori approfondimenti e soprattutto la validazione su un numero maggiore di campioni.

Per l'acido butirrico e per l'acido propionico emerge una differenza statisticamente significativa tra il gruppo AN e il gruppo OB e tra il gruppo AN e il gruppo SG; mentre per l'acido acetico la differenza è risultata significativa soltanto tra il gruppo AN e il gruppo OB. Queste differenze sono quasi certamente da attribuire allo scarso apporto dietetico del gruppo AN, come emerge anche dall'analisi dell'inchiesta alimentare.

I nostri risultati sono in accordo con recenti studi che hanno evidenziato che il contenuto in SCFA nelle feci di individui obesi è superiore rispetto a quello di soggetti magri, nonostante negli obesi sia stata riscontrata una minore quantità di batteri intestinali appartenenti a ceppi saccarolitici (42).

Anche Schwartz (101) ha riportato una maggiore concentrazione di SCFA nelle feci di soggetti obesi rispetto ai magri, e ciò viene giustificato sia con un loro ridotto assorbimento intestinale, sia con la possibile presenza di ceppi batterici che hanno bassa efficienza

nell'utilizzare gli SCFA come fonte di energia. Altre motivazioni possono essere sia il risultato di un'amentata produzione di SCFA da parte dei microrganismi intestinali, cambiamenti nei modelli di alimentazione microbica, ridotto assorbimento a livello della mucosa intestinale o anche modifiche della velocità di transito intestinale.

Inoltre, secondo Armougom, negli AN si svilupperebbero particolari ceppi batterici (come *Faecalibacterium prausnitzii*) nel microbiota intestinale, capaci di fermentare con maggiore efficienza le fibre solubili della dieta, con produzione di SCFA (96). Negli AN, inoltre, verrebbe promosso un maggior assorbimento degli SCFA fecali, al fine di compensare lo scarso apporto calorico della dieta, cosa che determinerebbe una minore concentrazione finale di SCFA nelle feci, perché appunto assorbiti nel sangue portale.

7. Conclusioni

Nel nostro studio, per la prima volta in letteratura, sono state messe a confronto 5 differenti popolazioni profondamente differenti per l'assetto metabolico-nutrizionale, le condizioni cliniche e la storia della patologia, con l'obiettivo di valutare le possibili reciproche influenze tra dieta, flora batterica intestinale e acidi grassi fecali a catena corta.

Oltre a quanto già clinicamente evidente ed ipotizzabile, nei quattro gruppi di pazienti e nel gruppo controllo, sono emerse differenze nella composizione della flora batterica intestinale e nel contenuto di acidi grassi fecali, confermando ipotesi di lavoro già note e fornendo informazioni utili che meritano ulteriori approfondimenti.

E' dunque auspicabile programmare studi che coinvolgano una maggiore numerosità di soggetti, magari studi multicentrici per poter allargare la numerosità dei soggetti in esame e confermare i risultati ottenuti magari riuscendo anche a dare delle spiegazioni plausibili.

8. Bibliografia

1. Raoult D. Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(8), 631-634.
2. Holines E, Li JY, Athanasion T, Ash rafian H, Nicholson JK. Vnderstanding the mole of gut microbiorne-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends Microbiol.* 2011;19(7), 349-359.
3. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rep.* 2010; 90(3), 859-904 .
4. Guamer F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *The Lancet* 2003; 361: 512-19.
5. Bengmark S. Pre-, pro- and synbiotics. *Curr Opin in Clin Nutr Metab Care* (2001), 4: 571-579.
6. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microhiol.* 1977;31:107-133.
7. Qin Li R, Raes .I, ci al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464:59-65
8. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005;307: 1915-1920
9. Palmer C, Bik EM, Digiulio 1313,Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007; 5(7), e177 .
10. Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after caesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 19-25.
11. Armsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, et Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30:61-7.
12. Enck P, Zimmermann K, Rusch K, Schwartz A, Klosterhalfen S, Frick JS. The effects of maturarion of the colonic microflora *Gastroenterol. Res. Prat.* 2009; 75 :2401.
13. Agans R, Rigsbee I, Kenche H. Michail S, Khamis I II, Paliy O. Distal microbiota of adolescent children is different from that of adults, *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011; 77(2), 404-412 .
14. Torroni F, Formi E, Pizze(. Exploring the diversiry of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(6), 1534-1539 .
15. Woodmansey EJ. Intestinal batteria and ageing. *J. Appl. Microbiol.* 102(5), 1178-1186 (2007).

16. Fallani M, Amarri S, Uusijarvi A et al. Determinants of the human infant intestinal microbiota after introduction of first complementary foods in five European centres. *Microbiology* 157(Pt 5),1385-1392 (2011).
17. De Filippo C, Cavalieri D, Di PM et al, Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and ritrai Africa. *Proc. Nati Acad. Sci.USA* 107(33), 14691-14696 (2010).
18. Arumugam M, Raes J, Pelletier E et Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473(7346), 174-180 (2011).
19. Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol* 1986; 132: 1467-56.
20. Wong JM, de SR, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40: 235-243.
21. Chen W7, Anderson D. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plan fibers in cholesterol-fed rata. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1984;175:215-218
22. Berggren AM, Nyman EM, Lundquist I, Bjorck IM. Influyente of orally and rectally administered propionate on cholesterol and glucose metabolism in obese rata. *Br. Num* 1996;76:287-294.
23. Gibson PR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP. Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonie epithelial cells in *vitro*. *J Gastroenterol Hapatol* 1992; 7: 165-172.
24. Siavoshian S, Segain JP, Kornoprobst M, et al. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 2000; 46: 507-514.
25. Lefebvre P, Cariou 13, Lien Kuipers Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* 2009;89:147-191.
26. Pierro A, van Saene HK, Donnell SC, *et al.* Microbial Translocation in neonates and infants receiving long-term parenteral nutrition. *Arch Surg* 1996; 131 : 176-179.
27. Bernet MF, Brassart D, Nesser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA I binds to cultured human intestina] celi lines and inhibits celi attachment and celi invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35: 483-489.
28. Hooper LV, Xu Falk PG, Midrvedt T, Gordon JI. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in acompetitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9833-9838
29. Brook J. Bacterial interference: *Crit Rev Microbiol* 1999; 25: 155-I 72.

30. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, *et al.* Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000; 47: 646-652.
31. Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol* 1998; 6: 13-18
32. Haverson K, Rehakova Z, Sinkora J, Sver L, Bailey M. Immune development in jejunal mucosa after colonization with selected commensal gut bacteria: A study in germ-free pigs. *két Immunol Immunopathol.* 2007;119:243-253.
33. Hapfeimeier S. Lawson MA, Slack E. *et al.* Reversible microbial colonization of genn-free mite reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science.* 2010;328:1705- I 709.
34. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, *et al.* Induction of ofcolonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science.* 2011;33 I :337-341.
35. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An inniuno-modulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell.* 2005;122:107-1 18.
36. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, *et al.* Induction of intestinal Th 17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009;139:485-498.
37. Mazmanian SK, Round .IL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature.* 2008;453: 620-625.
38. Luhrs H, Gerke T, MullerJG, *et al.* Butyrate inhibits N E-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis, *Scand .I Gastroenterol.* 2002;37:458-466.
39. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 2009;46 I: I 282-1286.
40. Krinos CM, Coyne MJ, Weinacht KG, Tzinabos AO, Kasper DL, Comstock LE. Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions. *Nature* 2001; 414: 555-558.
41. Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L V., Koh, G. Y., Nagy, A. *et al.* (2004). The gut I microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 15718-15723
42. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
43. Ley, R. E., Backhecl, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Nati Acad. Sci. USA* 102, 11070-11075

44. Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 15451-15455.
45. Denechaud, P. D., Dentin, R., Girard, J., & Postic, C. (2008). Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett.* 582, 68-73.
46. Fleissner, C. K., Huebel, N., El-Bary, M. M., Loh, G., Klaus, S., & Blaut, M. (2010). Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br. J. Nutr.*, 1-11.
47. Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837-848.
48. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Mein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.
49. Cani, P. D., Datibioul, C. A., Reusens, B., Remacle, C., Catillon, G., & Delzenne, N. M. (2005). Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1(7-36) amide on the glycemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *J. Endocrinol.* 185, 457-465.
50. Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Maton, N., & Delzenne, N. M. (2005). Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes. Res.* 13, 1000-1007.
51. Cani, P. D., Joly, E., Horsmans, Y., & Delzenne, N. M. (2006). Oligofructose promotes satiety in healthy human: A pilot study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 60, 567-572.
52. Cani, P. D., Knauf, C., Iglesias, M. A., Drucker, D. J., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2006). Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes* 55, 1484-1490.
53. Ley, R. E. (2010). Obesity and the human microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 201026:5-11.
54. Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., & Raoult, D. (2009). Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS ONE* 4, e7125.
55. Ramirez-Farias, C., Slezak, E., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., & Louis, P. (2009). Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Blautia obeum* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br. J. Nutr.* 101, 541-550.
56. Furet, J. P., Kong, L. C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J. L., et al. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade

inflammation markers. *Diabetes* 59, 3049-3057.

57. Raoult, D. (2008). Human microbiome: Take-home lesson on growth promoters? *Nature* 454, 690-691.
58. Delzenne, N., & Reid, G. (2009). No causal link between obesity and probiotics. *Net, Rev. Microbio*. 7, 901.
59. Santacruz A., Marcos, A., Warnberg, J., Matti, A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., et al. (2009). Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 17, 1906-1915.
60. Balamurugan R., George, G., Kaheerdoss, J., Hepsiba, J., Chandragunasekaran, A.M., and Ramakrishna, B. S. (2010). Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium I prausnitzii* in obese Indian children. *Br. J. Nutr.* 103, 335-338.
61. Lieto, R., Laitinen, S., Nermes, M., Isolami, E. (2010). Impact of maternal probiotics supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal (and postnatal) growth: a double-blind, placebo-controlled study. *Br. J. Nutr.* 103, 1792-1799.
62. Amandine Everard, Clara Belzer, Lucie Geurts, Janneke P. Ouwerkerk, Celine Druart, Laure B. Bindels, Yves Guiot, Muriel Derrien, Giulio G. Muccioli, Nathalie M. Delzenne, Willem M. De Vos, and Patrice D. Cani (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *PNAS* 9066-9071, vol. 110 no. 22.
63. Everard A., et al. (2011). Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60(11): 2775-2786.
64. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796-1808.
65. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821-1830.
66. Tordjman, J., Guerre-Millo, M., & Clement, K. (2008). Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity. *Diabetes Metab*, 34, 658-663.
67. Olefsky, J. M., & Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219-246.
68. Kosteli, A., Sugaru, E., Haemmerle, G., Martin, J. F., Lei, J., Zechner, R., et al. (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 120, 3466-3479.
69. Cani, P. D., Hoste, S., Guiot, Y., & Delzenne, N. M. (2007). Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal

colon of rats. *Br. J. Nutr.* 98, 32-37.

70. Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Lava, F., Knauf, C., Burcelin, R. G., Tuohy, K. M., et al. (2007). Selective increases of *Blautia* in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374-2383.
71. Davis, J. E., Gabler, N. K., Walker-Daniels, J., & Spurlock, M. E. (2008). Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1248-- 1255.
72. Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., et al. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470-1481.
73. Erridge, C., & Samani, N. J. (2009). Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1944-1949.
74. Amar, L., Burcelin, R., Ruidavets, J. B., Cani, P. D., Fauvel, J., Alessi, M. C., et al. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am. J. Nutr.* 87, 1219-1223.
75. Creely, S., McTernan, P. G., Kusminski, C. M., Fisher, M., da Silva, N., Khanolkar, M., et al. (2007). Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E740-E747.
76. Anderson, P. D., Mehta, N. N., Wolfe, M. L., Hinkle, C. C., Pruscino, L., Comiskey, L. L., et al. (2007). Innate immunity modulates adipokines in humans. *Endocrinol. Metab.* 92, 2272-2279.
77. Anderson, A. S., Larsen, N., Pedersen-Skovsgaard, T., Berg, R. M., Møller, S., Sventenius, D., et al. (2010). Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Nutr.* 1-8.
78. Al-Attas, O. S., Al-Daghri, N. M., Al-Rubeaan, K., da Silva, N. F., Sabico, S. L., Kumar, S., et al. (2009). Changes in endotoxin levels in T2DM subjects under anti-diabetic therapies. *Cardiovasc. Diabetol.* 8, 20.
79. Ghanim, H., Abuayyeh, R. W., & Smith, C. W. (2010). TLR2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. *FASEB J.* 24, 731-739.
80. Laugerette, F., Vors, C., Giloen, A., Chauvin, M. A., Soulage, C., Lambert-Porcheron, S., et al. (2011). Emulsified lipids increase endotoxemia: Possible role in early postprandial low-grade inflammation. *Nutr. Biochem.* 22, 53-59.
81. Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, E., Tzameli, I., Yin, H., & Flier, J. S. (2006). Innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 3015-3025.

82. Suganami, T., Miecina, T., Itoh, M., Shimoda, Y., Ka mei, Y., & Ogawa, Y. (2007). Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 45-49.
83. De La Serre, C. B., Ellis, C. L., Lee, J., Hartman, A. L., Rutledge, J. C. & Raybould, H. E. (2010). Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G440-G448.
84. Muccioli, G. G., Naslain, D., Backhed, E., Reigstad, C. S., Lambert, D. M., Delzenne, N. 91., et al. (2010). The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mot. Syst. Bio!*. 6, 392.
85. Mazzon, E., & Cuzzocrea, S. (2008). Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress. *Ant. J. Physiol, Gastrointest Liver Physiol.* 294, G1268-G 1280.
86. Cani, P. D., Possemiers, S., Van de, W. T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., et al. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091-1103.
87. Kleessen, Hartmann, L., & Blaut, M. (2003). Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *Br. J. Nutr.* 89, 597-606.
88. Deitel M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obes Surg.* 2003;13:329.
89. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults. *JAMA.* 2002;288:1723-7.
90. Sturm R. Increases in clinically severe obesity in the United States 1986-2000. *Arch Intern Med* 2003;163:2146-8.
91. Clément K, Sorensen TIA (eds). *Obesity: Genomics and Postgenomics*. Informa Healthcare, 2007, pp 1-600.
92. Prentice AM, Hennig BJ, Fulford AJ. Evolutionary origins of the obesity epidemic: natural selection of thrifty genes or genetic drift following predation release? *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 1607-1610.
93. Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. Obesity and the environment: where do we go from here? *Science* 2003; 299: 853-855.
94. Kim MJ, Marchand P, Henegar C, Antignac JP, Alili R, Poitou C *et al.* Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 377-383.
95. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 313-323.
96. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring

bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS ONE* 4(9), e7125 (2009).

97. Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Raoult D. Obesity-associated Gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *J. Obesity* doi:10.1038/ijo.2011.153 (2011) (Epub ahead of print).
98. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* 2007; 87: 507-520.
99. Zuo HJ, Xie ZM, Zhang WW *et al.* Gut bacteria alteration in obese people and its relationship with gene polymorphism. *World J. Gastroenterol.* 17(8), 1076-1081 (2011)
100. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan U, Li L, Baker SB, Johnson MD *et al.* Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 2007; 13: 803-811.
101. Schwiertz A, Taras D, Schafer K *et al.* Microbiota and SCFA in Lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* 18(1), 190-195 (2010).
102. Zhang H, DiBaise JK, Zoccolo A *et al.* Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106(7), 2365-2370 (2009).
103. Nadal L., Santacruz A, Marcos A *et al.* Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int. J. Obes. (Lond.)* 33(7), 758-767 (2009).
104. Santacruz A, Marcos A, Warnberg I *et al.* Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 17(10), 1906-1915 (2009)
105. Kalliomaki M, Collado MC, Salminen S, Isolanti E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin. Nutr.* 87(3), 534-538 (2008).
106. Duncan SII, Lobley GE, Holtrop G *et al.* Human colonie: microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *J. Obes. (Lond.)* 32(11), 1720-1724 (2008).
107. Santacruz A, Marcos A, Warnberg I *et al.* Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 17(10), 1906-1915 (2009).
108. Yager J, Anderson AE. Anorexia nervosa. *N Engl J Med* 2005;353:1481-8.
109. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM-IV-TR. 4th ed. Washington, D.C: American Psychiatric Association; 2000.
110. Karczewska-Kupczewska M, Strackowski M, Adamska A, *et al.* Insulin sensitivity, metabolic flexibility, and serum adiponectin

concentration in women with anorexia nervosa. *Metabolism* 2010;59:473-7.

- 111.Dostalova I, Smitka K, Papezova H, Kvasnickova H, Nedvidkova J. Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: the role of adipocytokines. *Physiol Res* 2007;56:587-94.
- 112.Pannacciulli N, Vettor R, Milan G, et al. Anorexia nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1748-52.
- 113.Matzkin, V.B., Geissler c., Coniglio R. et al. : Cholesterol concentration in patients with anorexia nervosa and in healthy control. *The International J . Psychiatric nurse Research*, 2006, 11, 1283-1293.)
- 114.Bluher S, Mantzaros CS. Leptin in humans: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr* 2009;89(Suppl):991S-7S.
- 115.Muoio DM, Dohm GL. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16:653-66.
- 116.Morris JA Jr, Selivanov V, Sheldon GF. Nutritional management of patients with malabsorption syndrome. *Clin Gastroenterol*. 1983 May; 12(2): 463-74.
- 117.Vanderhoof JA, Langnas AN. Short-Bowel Syndrome in children and adults. *Gastroenterology* 1997; 113: 1767-1778.
- 118.Griffen WO Jr, Richardson JD, Medley ES. Prevention of small bowel contamination by ileocecal valve. *South Med J*. 1971 Sep; 64(9): 1056-8.
- 119.Clinical Issues Committee of the American Society for Metabolic and Bariatric Surgery. Position statement: sleeve gastrectomy as a bariatric procedure. *Surg Obes Rel Dis*. 2007;3:573-6.
- 120.Deitel M, Croshy R, Gagner M. The first international consensus summit for sleeve gastrectomy (SG), New York City, October 25... 27,2007. *Obes Surg*. 2008;18:487-96.
- 121.Mognol P, Chosidow D, Marmuse J. Laparoscopic sleeve gastrectomy as an initial bariatric operation for high-risk patients: initial results in 10 patients. *Obes Surg*. 2005;15:1030.-3.
- 122.Lee CM, Cirangle PT, Jossart Vertical gastrectomy for morbid obesity In 216 patients; report of two-year results. *Surg Endosc*. 2007;21:1810-6.
- 123.Himpens I, Dapri G, Cadiere G. A prospective randomized study between laparoscopic gastric banding and laparoscopic isolated sleeve gastrectomy: results after 1 and 3 years. *Obes Surg*. 2006;16:1450-6.
- 124.Han MS, Kim WW, Oh JH. Results of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) at 1 year in morbidly obese Korean patients. *Obes Surg*. 2005;15:1469-75.

125. Gagner M, Deitel M, Kalberer TL, et al. Symposium review: the second international consensus summit for sleeve gastrectomy, March 19-21, 2009. *Surg Obes Rel Dis.* 2009;5:476--85.
126. Cani PD, Delzenne NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 737-743.
127. Shalhub S, Parsee A, Gallagher SF, et al. The importance of routine liver biopsy in diagnosing non-alcoholic steatohepatitis in bariatric patients. *Obes Surg* 2004 ; 14: 54-59.
128. Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *N.E.J.M.* 2002; 346:1221-31.
129. Logan BK, Jones AW. Endogenous ethanol auto-brewery syndrome as a drunk driving defense challenge. *Med Sci Law* 2000; 40:206-15.
130. Kushner RF. Bioelectrical impedance analysis: a review of principles and applications.
131. Fidanza F., Liguori G., Mancini F. "Lineamenti di Nutrizione Umana" Idelson, pp. 306-329 – 1969
132. Saverymuttu SH, Joseph AEA, Maxwell JA. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *Br Med J.* 1986;292:13-5
133. Ricci C, Longo R, Gioulis E, et al. Noninvasive in vivo quantitative assessment of fat content in human liver. *J Hepatol.* 1997;27:108-13)
134. G. del Genio, I. De Sio, et.al. Noninvasive evaluation of abdominal fat and liver changes following progressive weight loss in severely obese patients treated with laparoscopic gastric bypass. *Obes Surg* (2009) 19:1664-1671).
135. *Analytical biochemistry* 236, 1-8, (1996).
136. Armougom F, Raoult D (2008) Use of pyrosequencing and DNA barcodes to monitor variations in Firmicutes and Bacteroidetes communities in the gut microbiota of obese humans. *BMC Genomics* 9: 576).
137. Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D (2008) Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 47: 33-43).
138. Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawets S, Misener S, (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press. pp 365-366).
139. Drasar BS, Roberts AK. Methods for the study of anaerobic microflora. In: Levett PN, ed. *Anaerobic microbiology: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 1991; 183-200)
140. Macy JM, Probst I. The biology of gastrointestinal bacteroides. *Annu Rev Microbiol* 1979; 65: 390-7
141. L. Santarpia, I. Torre et al., Intestinal bacterial flora in neurologically

impaired patients on long-term enteral nutrition. *Nutritional Therapy & Metabolism* Vol.25 no.2, pp. 89-96 Wichtig Editore, 2007).

142. Mackowiak PA. The normal microbial flora. *N Engl J Med* 1982; 307: 83-93
143. Franks H, Harmsen HJM, Raangs GC, et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group—specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3336-45
144. Bottari B, Ercolini D, Gatti M, Neviani E (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 485-494
145. Turroni F, Ribbera A, Foroni E, Douwe van Sinderen, Ventura M (2008). Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2008 Jun;94(1):35-50.
146. Lagier JC et al. (2012) Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2012, vol.2 article 136.